



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale.

قسم : بيولوجيا الحيوان.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Toxicologie*

Intitulé:

**L'effet préventif des flavonoïdes contre l'hépatotoxicité induite
par le CCL₄.**

Présenté et soutenu par : Le : 27/06/2018

BOUABDALLAH Oumnia.

BELABIOD Mira.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme Ameddah Souad Professeur UFM Constantine.

Rapporteur : Mr Benrebai Mouad M-CA UFM Constantine.

Examineurs : Mme Baali Nacira M-CB UFM Constantine.

Mr Kandouli Chouâib M-CB UFM Constantine.

***Année universitaire
2017- 2018***

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à remercier Allah, de nous avoir donné la force, la volenté et beaucoup de patience pour achever cette modeste étude .

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements et le plus grand respect à notre encadreur monsieur **BENREBAI** Mouad pour sa disponibilité, son aide et ses conseils judicieux avec dévouement tout au long de ce travail.

Nos vifs remerciements aux membres du jury pour l'honneur qui nous ont fait d'avoir accepté d'examiner notre mémoire.

Nous tenons à remercier et à exprimer nos profondes gratitudes à nos Professeurs **AMEDDAH** Souad et **MENAD** Ahmed pour leur aide, soutien et encouragement tout au long de ce travail.

Un grand remerciement à monsieur **BOULKANDOUL** Ramzi pour son aide.

Nous tenons également à remercier nos camarades **Kaouter** et **Taki eddine**

Merci à ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce mémoire soit réaliser.

Dédicace

Tout d'abord, je remercie Allah le Miséricordieux

Je dédie ce modeste travail à:

Mes très chères parents **NASREDINE** et **HALIMA** qui avec beaucoup d'amour et de tendresse n'ont jamais cessé de m'encourager et de prier pour moi ; ce travail est le fruit de leurs sacrifices pour mon éducation. Nul mot ne serait exprimé ma reconnaissance, ma gratitude et mon amour envers vous. Qu'Allah le tout Puissant vous préserve et vous accordela santé, du bonheur et une longue vie.

Mes chères adorables sœurs **DINA** et **NOUR** et à mon âme-sœur **MERIEM** qu'Allah le tout Puissant vous protège et vous garde pour moi.

Mon binôme **MIRA**, tu es ma sœur, mon amie et plus qu'une cousine.

Je te souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.

Ma grande famille,précisément mes grands-parents et mes tantes **ATFA**,
FARIDA et **WAFIA**.

Merci à mes enseignants de l'école primaire jusqu'à l'université.

Merci à mes amis et mes camarades de toxicologie avec lesquels j'avais passé des bons moments pendant ce cursus, je vous souhaite tout le succès.

Merci à ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce mémoire voie le jour.

Bouabdallah Oumnia

Dédicace

Tout d'abord, je remercie Allah le Miséricordieux

Je dédie ce modeste travail a :

La mémoire de mes chers grands-parents **LEILA ; ZARADA et BELKACEM**

Mes très chers parents **RIAD et ATFA** qui avec beaucoup d'amour et de tendresse n'ont jamais cessé de m'encourager et de prier pour moi ; ce travail est le fruit de leurs sacrifices pour mon éducation. Nul mot ne serait exprimé ma reconnaissance, ma gratitude et mon amour envers vous. Qu'Allah le tout Puissant vous préserve et vous accorde de la santé, du bonheur et une longue vie.

Mes chers frères **MOUHAMED et KHALIL** ; mes sœurs **IMEN et CHAIMA** mes anges **WASSIM et KHADIDJA** qu'Allah le tout Puissant vous protège et vous garde pour moi.

Mon binôme **OUMNIA**, tu es ma sœur et mon amie plus qu'une cousine je te souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.

A l'homme de ma vie **Ms ROBAI HAMZA** qu'Allah le tout puissant te garde pour moi jusqu'à l'éternité.

A ma grande famille et plus précisément mes tante **HALIMA et FARIDA** ;
mon grand-père **BELABIOD ABDELBAKI**

Merci à mes enseignants de l'école primaire jusqu'à l'université,

Merci à mes amis et mes camarades de toxicologie, je vous souhaite tout le succès.

Merci à ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce mémoire voie le jour.

Belabiod Mira

SOMMAIRE

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Liste des abréviations.

	Page
Introduction	01
Partie I : Rappels Bibliographiques.	
I- Le foie	03
1- L'unité structurelle et fonctionnelle du foie	03
2- Les principaux types de cellules de foie	04
2-1-Les cellules parenchymateuses.....	04
2-2-Les cellules non parenchymateuses	04
3- La biotransformation	05
4-Le cytochrome p450 et les hépatocytes	06
II- Hépatotoxicité et Xénobiotiques	07
1- L'hépatotoxicité	07
2- Mécanismes moléculaires sous-jacents aux lésions hépatiques	08
2-1-Le stress oxydatif.....	08
2-1-1-Le stress oxydatif et la peroxydation lipidique (LPO).....	11
2-1-2-Le stress oxydatif et l'inflammation.....	12
2-2-L'apoptose et la nécrose.....	13
III- Le tétrachlorure de carbone (CCL₄)	16
1- Définition	16

2- La toxicocinétique	16
3- Le mécanisme d'hépatotoxicité	16
4- La physiopathologie hépatique par le CCl4	17
4-1-La stéatose hépatique.....	18
4-2-La nécrose et l'apoptose hépatocytaire.....	19
4-3-La fibrose hépatique.....	20
4-4-La cirrhose hépatique.....	21
IV- Les antioxydants	22
1- Définition	22
2- Classification	22
2-1-Les antioxydants enzymatiques.....	22
2-1-1-Les superoxydes dismutases.....	22
2-1-2-La catalase.....	22
2-1-3-La glutathion réductase (GR).....	23
2-1-4-La glutathion peroxydase (GPx).....	23
2-2-Les antioxydants non enzymatiques.....	23
2-2-1-Le Glutathion «GSH».....	23
2-2-2-La vitamine C «l'acide ascorbique».....	24
2-2-3-La vitamine E.....	24
V- Les flavonoïdes	25
1- Définition	25
2- La Structure chimique	25
3- La classification	25
4- La pharmacocinétique	26

5- Les activités biologiques des flavonoïdes.....	27
5-1-L'activité antioxydante.....	28
5-1-1-La relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes.....	28
5-2-L'activité anti-inflammatoire.....	29
Partie II : partie pratique.	
I- Matériel et méthodes.....	30
1- Matériel.....	30
1-1- Matériel végétale « <i>Genista sp</i> ».....	30
1-1-1-La présentation du genre <i>Genista</i>	30
1-1-2-L'extraction.....	30
1-2-Matériel biologique.....	30
1-3-Réactifs et solvants.....	31
1-4-Appareillage.....	31
2-Méthode.....	31
2-1-Prévention et induction de la toxicité.....	31
2-2-Le traitement des animaux.....	32
2-3-Prélèvement du sang.....	32
2-4-Récupération du foie.....	32
2-5-Préparation de l'homogénat et de la fraction cytosolique du foie.....	32
2-6-Dosage des paramètres biochimique.....	33
2-6-1-Dosage des transaminases.....	33
2-6-2-Dosage des triglycérides.....	33

2-7-Dosage des paramètres de stress oxydatif.....	34
2-7-1-Dosage du malondialdhyde (MDA).....	34
2-7-2-Dosage de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique.....	35
2-7-3-Détermination du taux du glutathion réduit (GSH).....	35
2-8-L'étude histologique.....	35
2-9-L'étude statistique.....	35
II- Résultats	36
Discussions	41
Conclusion et perspectives	46
Résumé	47
<i>Références bibliographiques.</i>	

Liste des figures

N	Titre de la figure	page
01	Structure globale du foie.	03
02	Le lobule hépatique.	03
03	Zonation structurale et fonctionnelle de lobule du foie.	04
04	Localisation des cellules hépatiques dans le lobule.	04
05	Représentation du métabolisme des xénobiotiques (X).	05
06	Le cycle du cytochrome P ₄₅₀ .	06
07	Pathogenèse de l'hépatotoxicité d'un xénobiotique.	07
08	La balance pro-oxydants/antioxydants.	09
09	Les mécanismes par lesquels les radicaux libres endommagent les cellules.	09
10	Le schéma général du mécanisme du stress oxydatif induit par divers facteurs dans les maladies hépatiques.	10
11	Le transport des électrons à travers la chaîne respiratoire mitochondriale et la production des ROS.	10
12	La production d'espèces réactives par les phagocytes.	11
13	Processus de peroxydation lipidique.	12
14	Génération extracellulaire des ROS par des cellules inflammatoires.	13
15	La relation entre la dose d'hépatotoxine et les modes de mort cellulaire.	14
16	Un modèle de trois voies d'hépatotoxicité.	15
17	Séquence chronobiologique d'événements au cours de dommages du foie provoqués par le tétrachlorure de carbone (CCl ₄).	17
18	Schéma de l'implication du stress du RE dans la stéatose hépatique induite par CCl ₄ .	18
19	Un diagramme schématique expliquant le début de la stéatose impliquant la dégradation de la MTP par le CCl ₄ .	19
20	La fibrogénèse hépatique.	20
21	L'altération vasculaire et architecturale de la cirrhose ((A) foie sain/ (B) Foie cirrhotique).	21
22	La classification des antioxydants.	22
23	L'interconnexion de la GR, de GPx et du glutathion	23
24	La localisation des antioxydants au niveau cellulaire.	24
25	La structure de base des flavonoïdes.	25
26	Les principales classes de flavonoïdes. (la classification est basée sur les variations de l'anneau C hétérocyclique).	26
27	Métabolisme des flavonoïdes.	27

28	(a) Le piégeage des ROS (R•) par les flavonoïdes (Fl-OH) et (b) des sites de liaison pour les ions métalliques.	28
29	Les caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une forte activité de piégeage des radicaux.	29
30	Le mécanisme de la quantification de la réaction de TBARS.	34
31	L'effet protecteur de l'extrait <i>n</i> -BuOH <i>Genista sp</i> (200 mg/Kg) sur le niveau sériques des enzymes ALT et AST des rats traités par CCl ₄ (2 ml/kg).	36
32	L'effet protecteur de l'extrait <i>n</i> -BuOH <i>Genista sp</i> . (200 mg/Kg sur le taux des glycérides (TG) sériques des rats traités par le CCl ₄ (2ml/kg).	36
33	L'effet protecteur de l'extrait <i>n</i> -BuOH <i>Genista sp</i> . (200 mg/kg) sur le taux de MDA chez les rats traités par CCl ₄ (2ml/kg).	37
34	L'effet protecteur de l'extrait <i>n</i> -BuOH <i>Genista sp</i> (200 mg/kg) sur le taux du GSH et l'activité SOD chez les rats traités par le CCl ₄ (2ml/kg).	38
35	L'analyse histopathologique	39

Liste des tableaux

N	Titre du tableau.	Page
01	Les espèces réactives de l'oxygène (ERO/ ROS) et les espèces réactives de l'azote (ERN/RNS).	8
02	Principaux groupes de flavonoïdes, les composés individuels et les sources alimentaires.	26

Liste des abréviations

4-HNE: 4-hydroxynonenal.

AGPI: Acide gras polyinsaturés.

ALT: Alanine Aminotransférase.

AND : Acide désoxyribonucléique.

ApoB: Apolipoprotéine B.

AST: Aspartate aminotransférases.

CAT: Catalase.

CCL₃' : Trichlorométhyle.

CCL₃OO' : Trichlorométhylperoxyl.

CCL₄: Tétrachlorure de carbone.

COOH: Groupement Carboxylique.

Cytp: Cytochrome P.

DO: Densité optique.

Fe²⁺ : ion ferreux.

FH: Fibrose hépatique.

FI-O·: Radical phénoxy flavonoïde.

FI-OH: Flavonoïdes.

GPx: Glutathion peroxydase.

GR: Glutathion reductase.

GSH: Glutathion réduit.

GSSG: Glutathion oxydé.

GST: Glutathion-S- transférases.

HSC: Cellule stellaire hépatique.

IP: Intrapéritonéal.

KC: Cellule de Küpffer.

L[•]: Radical lipidique.

LOO[•]: Radical lipidique peroxyde.

LOOH : Hydroperoxyde lipidique.

LPH: Lactase phlorizine hydrolase.

LPO: Peroxydation lipidique.

MDA: Malondialdéhyde.

MEC: Matrice extracellulaire.

MMP : Métalloprotéinase matricielle.

MPT: Transition de perméabilité mitochondriale.

MTP: Protéine de transfert des triglycérides microsomaux.

NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

***n*-BuOH:** Extrait butanolique.

NH₂: GroupementAmine.

OH: Hydroxyle.

Pds crp: Poids corporel.

R[•]:Radical libre.

RE: Réticulum endoplasmique.

RNS: Espèces réactives oxygénées.

ROO[•]: Radical peroxy.

ROS: Espèces réactives oxygénées.

SH: Groupement Sulfhydryle.

SO : stress oxydatif.

SOD: Superoxyde dismutase.

SULT: Sulfotransférases.

TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances.

TG: Triglycéride.

TIMP: Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases.

TNF- α : Facteur de Nécrose Tumorale.

UGT: UDP- glucuronosyltransférases UGT.

α - TO' : Radical Tocophéroxy.

α - TOC: Alpha-tocophérol.

INTRODUCTION

Introduction.:

Les flavonoïdes sont des composés phytochimiques phénoliques qui représentent des constituants substantiels du régime humain et sont censés de garder en bon santé l'individu, par leurs diverses activités biologiques, notamment les effets antioxydants, inhibiteurs de la peroxydation lipidique et les effets anti-inflammatoires (**Pavanato et al, 2007; Hung Hung Ha et al, 2015**).

Malgré les progrès de la médecine moderne, les médicaments utilisés dans le traitement des maladies du foie ont une efficacité limitée. Il y a donc un besoin important pour recourir aux médicaments efficaces pour remplacer / compléter ceux en usage courant. Le règne végétal est sans aucun doute riche en ces agents médicinaux (**Adewusi et Afolayan, 2010**) Par conséquent, des études sur les plantes médicinales ou comestibles sont ciblées dans l'espoir de trouver de nouvelles molécules plus efficaces avec de faibles effets indésirables (**Maameri et al, 2015**). À cet égard, les flavonoïdes et autres polyphénols ont attiré l'attention des chercheurs dans ce domaine (**Mir et al, 2010**).

Les troubles hépatiques sont généralement causés par des produits chimiques toxiques, des médicaments ou des infections pathogènes, et sont considérés comme problèmes de santé publique graves (**Gordillo et al, 2017;Chao et al, 2013**). En effet, le foie est l'organe vital dans le corps des mammifères, il contribue indirectement au bon fonctionnement des autres organes en maintenant une homéostasie (**Andrade et al, 2015**). Il est constitué de cellules appelées hépatocytes (~ 80%), qui exercent de multiples fonctions physiologiques consistant à la biotransformation et l'élimination des déchets y compris les xénobiotiques (**Xie et al; 2016**).

Le stress oxydatif excessif causé par les espèces oxygénées réactives et les espèces réactives azotées augmente le risque de lésions hépatiques par l'oxydation des biomolécules notamment les lipides et par la libération de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α et l'interleukine (**Narasimha et al, 2017**)

L'un des meilleurs modèles de lésions hépatiques provient du tétrachlorure de carbone (CCl_4) dont plus de 50 000 études ont été réalisées jusqu'à présent (**Mir et al, 2010; Scholten et al, 2015**).

Le CCl_4 est un solvant utilisé dans l'industrie chimique et il est bien connu par ses effets néfastes sur la santé notamment l'hépatotoxicité (**Adewale et al, 2014**). Comme il s'avère très utile comme substance expérimentale pour l'étude de certains effets hépatotoxiques pour le

criblage de l'activité anti-hépatotoxique / hépato-protectrice des médicaments et des extraits de plantes, car l'hépatotoxicité induite par le CCl_4 est similaire à l'analogie de la lésion hépatique par une variété d'hépatotoxines chez l'homme (**Zhan et al, 2016**).

Le mécanisme hépatotoxique de CCl_4 a été étudié depuis 1967 (**Yoshioka et al, 2017**) dont le stress oxydatif a été accepté comme l'une des principales causes de la lésion hépatique induite par le CCl_4 (**Yang et al, 2015**) qui agit après transformation métabolique. Il est métabolisé dans le réticulum endoplasmique par les enzymes du cytochrome p450 (principalement CYP2E1) en radical trichlorométhyl ($\text{CCl}_3\bullet$) qui réagit rapidement avec l'oxygène pour former le radical trichlorométhylperoxyl ($\text{CCl}_3\text{OO}\bullet$) hautement réactif (**Ritesh et al, 2015**). Ces radicaux libres de CCl_4 sont responsables des lésions membranaires, de la libération consécutive d'enzymes marqueurs d'hépatotoxicité comme les transaminases (**Yang et al, 2015**) et de l'activation des cellules de Kupffer, qui s'accompagne de la production de médiateurs pro-inflammatoires (**Rosa et al, 2010**).

Dans l'ensemble, le traitement par CCl_4 peut entraîner une stéatose, une inflammation, une apoptose et une nécrose centro-lobulaire. Si les dommages dépassent la capacité de réparation du foie, le foie évoluera vers la fibrose, la cirrhose et l'hépatocarcinome (HCC) (**Dalton et al, 2009; Bona et al, 2012**).

Plusieurs d'études ont montré que des substances d'origines végétales ont manifesté une activité antioxydante, empêchant les dégâts causés au foie par le CCl_4 car elle contient des piègeurs des radicaux libres comme les flavonoïdes (**Laouar et al, 2017**).

À cet effet, on suppose que l'utilisation de l'extrait *n*-butanolique (*n*-BuOH) de la plante *Genista sp* riche en flavonoïdes, a un effet hépato-protecteur contre les lésions hépatiques induites par le CCl_4 .

Dans cette étude on a choisi le CCl_4 comme substance hépatotoxique qui peut provoquer des lésions hépatiques d'une part et l'utilisation de l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* riche en flavonoïdes afin d'évaluer l'effet hépato-protecteur des flavonoïdes contre la nocivité de cette substance toxique d'autre part.

LE FOIE

I-Le foie :

Le foie est l'organe vital dans le corps des mammifères, il contribue indirectement au bon fonctionnement des autres organes en maintenant une homéostasie (Andrade et al, 2015).

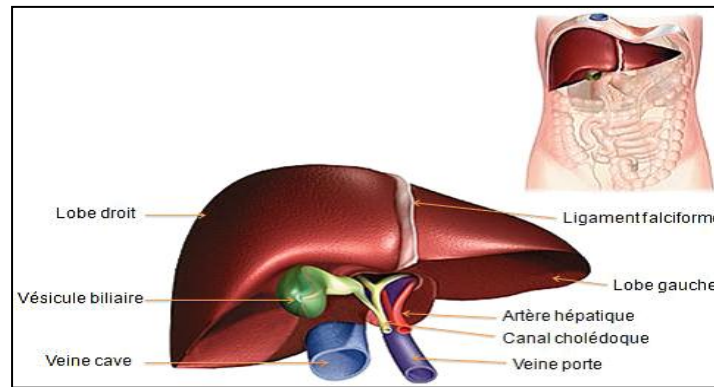


Figure N°1: Structure globale du foie (Schünke et al, 2007).

1-L'unité structurelle et fonctionnelle du foie :

Le lobule est à la fois l'unité structurelle et fonctionnelle classique du foie (Ishibashi et al, 2009). Il est de forme hexagonale avec une veine centrale au milieu. Les angles de l'hexagone sont formés par des triades portales (Horn et al, 2003). Des plaques de cellules parenchymateuses s'organisent au sein du lobule à partir de la veine centrale vers la périphérie du lobule, séparés les uns des autres par les sinusoides hépatiques (les «capillaires» du foie) bordées par l'endothélium sinusoidal (LeCluyse et al, 2012), entre la membrane des cellules endothéliales et la membrane des hépatocytes existe un petit espace impliqué dans l'échange entre le sang et les hépatocytes appelé l'espace de Disse (Krishna, 2013; Kietzmann, 2017).

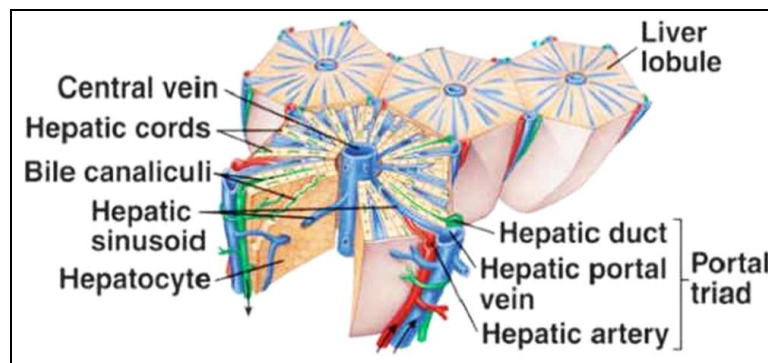


Figure N°2: Le lobule hépatique

<https://hepatologist.sharepoint.com/siteimages/hepatic%20sinusoid.jpg>.

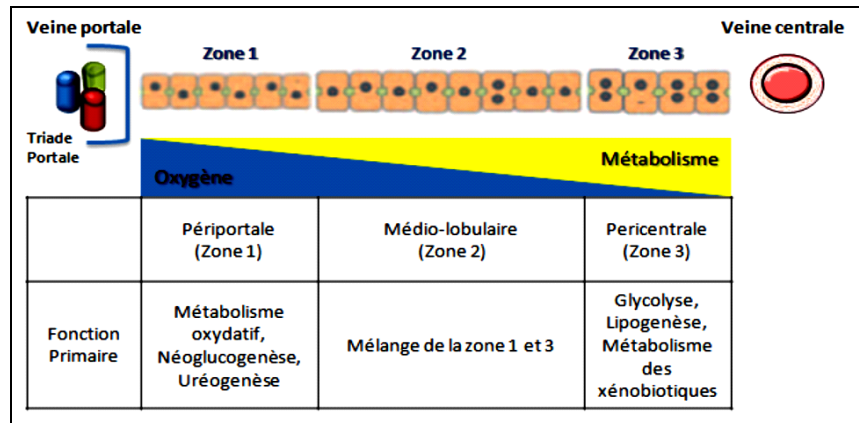


Figure N°3: Zonation structurale et fonctionnelle du lobule du foie (LeCluyse et al, 2012).

2-Les principaux types de cellules du foie :

Le foie est composé de nombreux types cellulaires qui sont divisées en deux catégories:

2-1-Les cellules parenchymateuses :

Constitué d'hépatocytes, qui représentent près de 60% de la population cellulaire totale du foie. Elles effectuent la majorité des fonctions physiologiques généralement associées au foie, y compris la biotransformation des xénobiotiques (LeCluyse et al, 2012).

2-2-Les cellules non parenchymateuses "cellules sinusoidales hépatiques" :

Elles représentent environ 40% des cellules hépatiques. Connectés directement à la circulation portale, constituent la première barrière contre les substances nocifs. Elles englobent principalement les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer (CK) qui sont des macrophages résidants dans le foie et les cellules stellaires ou les cellules de Ito qui contrôlent la production de la matrice extracellulaire (MEC), sont les principales sources cellulaires pour la production des protéines de la MEC telles que le collagène (Gregory et wing, 2002; Ishibashi et al, 2009; Wang et al, 2010; LeCluyse et al, 2012 ; Fujita et Narumiya, 2016).

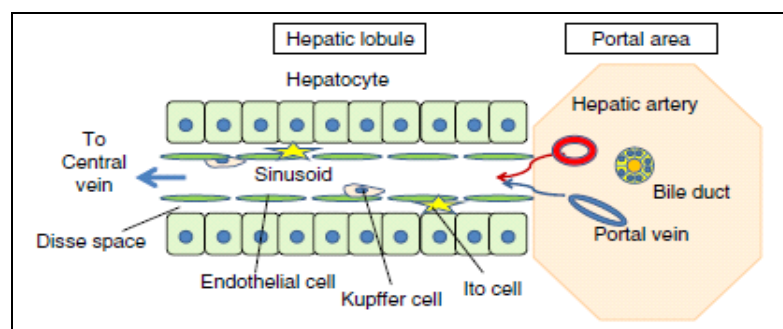


Figure N°4: Localisation des cellules hépatiques dans le lobule (Ishibashi et al, 2009).

3.-La biotransformation :

Le foie possède de nombreuses fonctions vitales, c'est un organe métaboliquement actif et il joue un rôle principal dans la détoxification des agents toxiques endogènes ou exogènes (les médicaments et d'autres xénobiotiques), via ses capacités de biotransformation (**Malarkey, 2005; Chiang, 2014**).

Le foie est le site principal de biotransformation (**Malarkey, 2005**). Cependant, ces biotransformations comprennent non seulement la détoxification, mais également l'activation de certains composés (par exemple, des pros médicaments) (**Sendenshy et Dufour, 2011**). Ainsi, un certain nombre de xénobiotiques relativement inertes, se sont révélés être transformés par des enzymes dans le corps en produits extrêmement toxiques (**Iyanagi, 2007**).

Il est généralement admis que la biotransformation des xénobiotiques est divisée en phases I ou phase de fonctionnalisation et phase II ou phase de conjugaison.

Les réactions de phase I permettent le démasquage ou l'ajout des groupements fonctionnels au composé parent. Ces groupements consistent le plus souvent en groupements –OH, –NH₂, –SH, ou –COOH. Les principales enzymes de cette phase sont les cytochromes P₄₅₀ qui réalisent des actions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse (**Jancova et al, 2010; Sendenshy et Dufour, 2011**).

Les réactions de la phase II sont catalysées par des transférases telles les glutathion-S-transférases (GST), les UDP- glucuronosyltransférases (UGT), Sulfotransférases (SULT), Ces réactions utilisent soit le composé parent, soit les groupements réactifs exposés ou ajoutés par le cytochrome P₄₅₀ et comprennent la glucuronidation, la sulfatation, l'acétylation et la méthylation. La plupart des réactions de phase II inactivent les xénobiotiques ou ses métabolites (**Iyanagi, 2007; Jancova et al, 2010; Schonborn et al, 2010**).

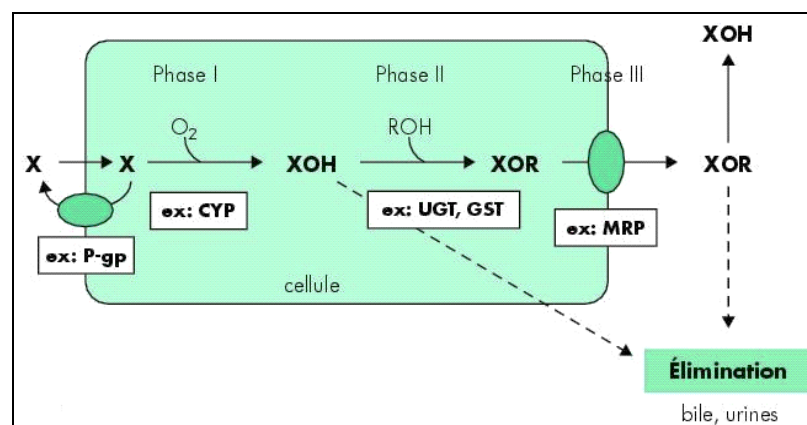


Figure N°5 : Représentation du métabolisme des xénobiotiques (X) (**Lecomte, 2006**).

4-Le cytochrome P₄₅₀ et les hépatocytes :

Les cytochromes P₄₅₀ sont une superfamille d'hémoprotéines, constituent la famille d'enzymes majeures capables de catalyser la biotransformation oxydative de la plupart des médicaments et d'autres xénobiotiques. Les cytochromes P₄₅₀ sont en nombre abondant dans le foie, et plus précisément localisés dans les membranes du réticulum endoplasmique (RE) des hépatocytes, préférentiellement exprimés dans la zone centrolobulaire du foie.

Sur 57 cytochromes P₄₅₀ humains supposés fonctionnels, environ une douzaine d'enzymes, appartenant aux familles cytochrome P₄₅₀ 1, 2 et 3, sont responsables de la biotransformation de la plupart des xénobiotiques (Guéguen et al, 2006; Wijnen et al, 2007; Zanger et Schwab, 2013).

Parmi toutes les enzymes du cytochrome P₄₅₀ dans le foie humain, le CYP_{3A4} est le plus abondant, suivi du CYP_{2E1} et du CYP_{2C9} (Almazroo et al, 2016).

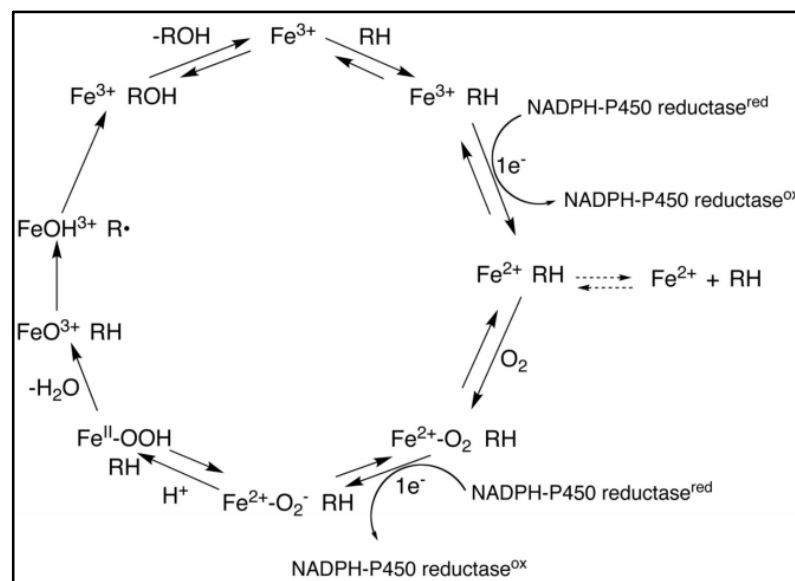


Figure 6: Le cycle du cytochrome P₄₅₀ (Isin et Guengerich, 2008).

HÉPATOTOXICITÉ
ET
XÉNOBIOTIQUES

II- Hépatotoxicité et Xénobiotiques :

1- L'hépatotoxicité :

L'hépatotoxicité implique des lésions hépatiques provoquées par des produits chimiques. Certains agents médicamenteux, lorsqu'ils sont pris en excès et parfois même lorsqu'ils sont pris à des doses thérapeutiques, peuvent altérer l'organe (**Thonda et Shivalinge, 2012**). D'autres agents chimiques, tels que ceux utilisés dans les laboratoires et les industries, des produits chimiques naturels (par exemple, les microcystines) peuvent également induire une hépatotoxicité. Les agents chimiques qui peuvent causer des lésions hépatiques sont appelés hépatotoxines (**Pandit et al, 2012**). Le rôle prédominant du foie dans le métabolisme des xénobiotiques rendent cet organe particulièrement vulnérable aux dommages causés par les produits chimiques auxquels nous sommes exposés (**Gu et Manautou, 2013**) et qu'ils peuvent affecter à la fois les cellules parenchymateuses et non parenchymateuses du foie, conduisant à une grande variété d'états pathologiques, y compris l'hépatite hépatocellulaire aiguë et chronique, la stéatose, la fibrose / la cirrhose, la cholestase (**Larrey, 2000**). Ces produits sont convertis en métabolites chimiquement réactifs dans le foie, telles que les radicaux libres qui ont la capacité de s'interconnecter avec les macromolécules cellulaires, conduisant à un dysfonctionnement protéique, une peroxydation lipidique, des dommages à l'ADN, un épuisement du glutathion réduit (GSH) et un stress oxydatif. Ainsi, ces réactions affectent les fonctions des organites cellulaires telles que les mitochondries, le RE et peuvent également sensibiliser les hépatocytes aux effets toxiques du système immunitaire (p. Ex. Cytokines, chimiokines) conduisant à la mort cellulaire éventuelle (**Gunawan et Kaplowitz, 2004; Robin et al, 2012**).

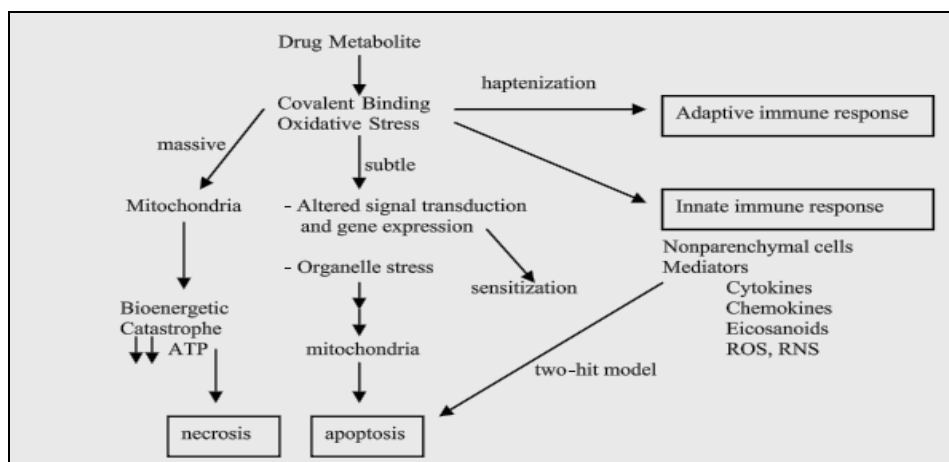


Figure N°7: Pathogenèse de l'hépatotoxicité d'un xénobiotique (**Gunawan et Kaplowitz, 2004**).

2- Mécanismes moléculaires sous-jacents aux lésions hépatiques :

Les principaux mécanismes moléculaires de la pathogenèse des lésions hépatiques induites par des xénobiotiques peuvent être résumés comme suit :

2-1- Le stress oxydatif :

Les radicaux libres (synonyme pro-oxydants), sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) contenant un ou plusieurs électrons non appariés (**Webb et Twedt, 2008**).

Dans le système biologique, les radicaux à base d'oxygène et les radicaux à base d'azote sont deux types de radicaux libres qui intègrent à la fois des espèces radicalaires et non radicalaires(**Li et al, 2015**).

Tableau N°1: Les espèces réactives de l'oxygène (ERO/ ROS) et les espèces réactives de l'azote (ERN/RNS) (**Tamizhamuthu et al, 2015**).

Reactive oxygen species	Reactive nitrogen species
<p style="text-align: center;">Free radicals:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Superoxide($O_2^{\cdot-}$) • Hydroxyl ($\cdot OH$) • Hydroperoxyl ($HOO\cdot$) 	<p style="text-align: center;">Free radicals:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nitricoxide($\cdot NO$) • Nitrylendioxide($\cdot NO_2$)
<p style="text-align: center;">Non radicals:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hydrogenperoxide(H_2O_2) • Hydrochlorousacid($HOCl$) 	<p style="text-align: center;">Non radicals:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Peroxynitrite ($ONOO^{\cdot-}$) • Alkyl peroxy nitrates ($RONOO$)

Dans des circonstances normales, ces radicaux libres ont des rôles bénéfiques tels que la défense contre les micro-organismes pathogènes (**Sid et al, 2013**). En effet dans des conditions normales, le métabolisme aérobie du foie conduit à la production, dans un état d'équilibre dynamique, des pro-oxydants, qui sont équilibrés par leur séquestration par des antioxydants, avec un taux similaire (**Andrade et al, 2015**).

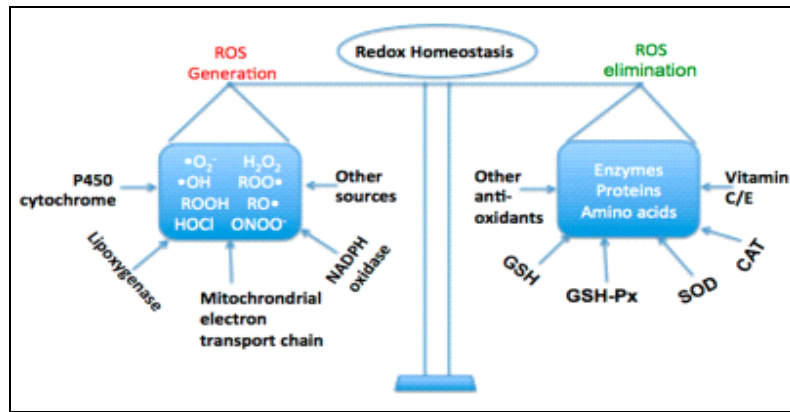


Figure N°8: La balance pro-oxydants/antioxydants (Li et al, 2015).

Le stress oxydatif (SO) existe lorsqu'il existe un déséquilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants en faveur des pro-oxydants dans la cellule (Sid et al, 2013). Il est impliqué dans diverses formes de maladies, dont la génération excessive de ROS épuise les antioxydants endogènes, qui par la suite, ne parviennent pas à piéger tous les ROS et en raison de leur réactivité, les ROS interagissent facilement avec toutes les macromolécules cellulaires conduisant à une lésion cellulaire (Jadeja et al, 2017; Muriel et Gordillo, 2016). Ce processus entraîne des anomalies structurelles et fonctionnelles dans le foie (Lach et Michalak, 2014).

Ainsi, le SO est considéré comme l'un des mécanismes pathologiques qui entraînent l'initiation et la progression de diverses maladies du foie, comme la stéato-hépatite (Li et al, 2015).

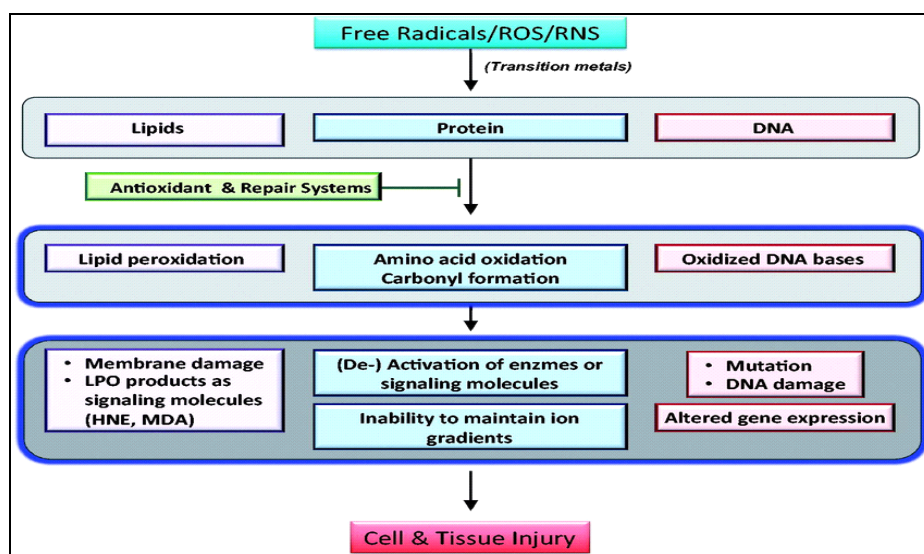


Figure N°9: Les mécanismes par lesquels les radicaux libres endommagent les cellules (Kehrer et Klotz, 2015).

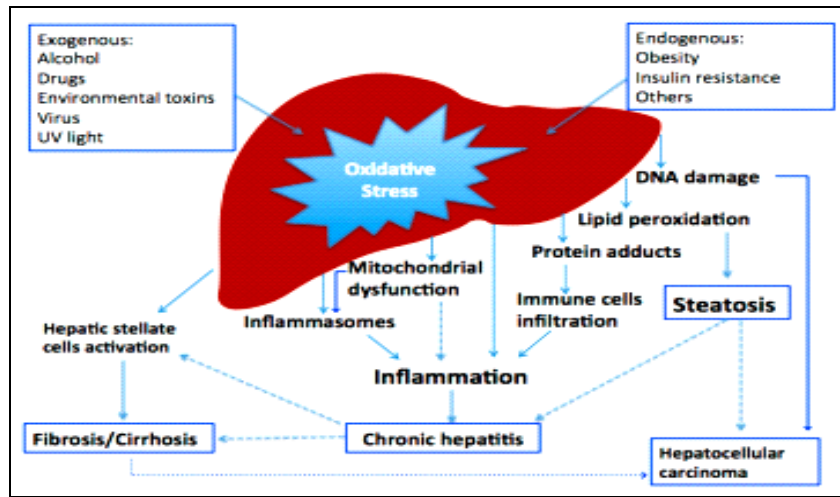


Figure N°10: Le schéma général du mécanisme du stress oxydatif induit par divers facteurs dans les maladies hépatiques (Li et al, 2015).

Les mitochondries hépatocytaires sont les principaux sites de production de ROS dans diverses formes de maladies du foie (Jadeja et al, 2017). Lors du transport électronique le long de la chaîne respiratoire, si le complexe III (coenzyme Q, cytochrome c oxydoréductase) ne peut pas recevoir d'électrons du CoQ (coenzyme Q ou ubiquinone), les électrons seraient captés par O_2 , ce qui pourrait produire des ROS principalement le superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et entraîne un stress oxydatif (Li et al, 2017).

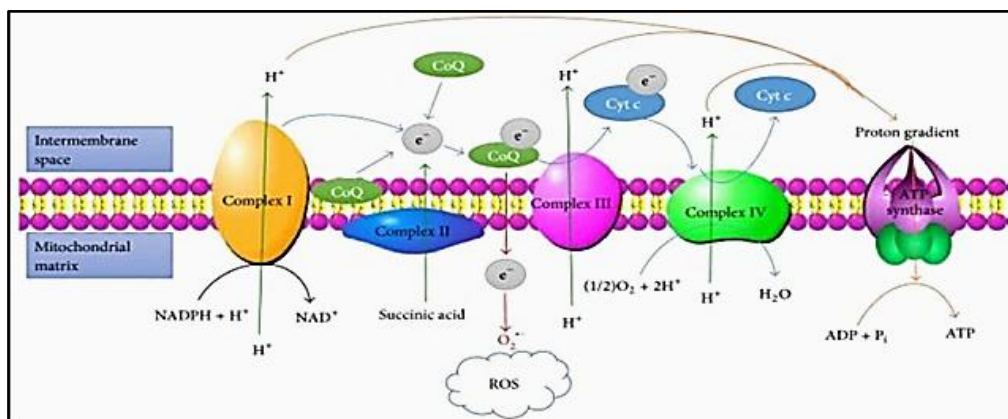


Figure N°11: Le transport des électrons à travers la chaîne respiratoire mitochondriale et la production des ROS (Li et al, 2017).

En plus des mitochondries, les RE peuvent également produire des ROS dans le foie via les enzymes du cytochrome P_{450} , et cette réaction peut se produire dans les macrophages et les neutrophiles (Lach et Michalak, 2014) et par d'autres enzymes tels que le complexe

nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (Nox) et l'oxyde nitrique synthase (NOS) (Skonieczna et al, 2017).

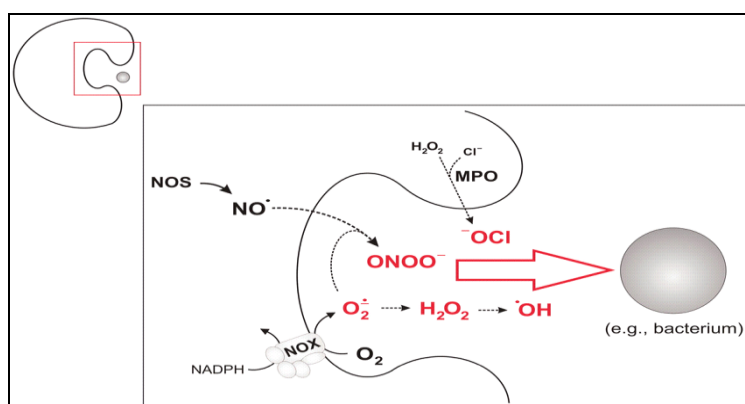


Figure N°12: La production des espèces réactives par les phagocytes (Kehrer et Klotz, 2015).

D'autre part, certains médicaments ou produits chimiques peuvent être réduits par le cytochrome P₄₅₀ réductase pour former des radicaux instables, qui transfèrent ensuite leurs électrons à l'oxygène moléculaire et forment des superoxydes. Ainsi, il existe un grand nombre de façon à former différents ROS et RNS dans différents endroits de la cellule (Jaeschke et al, 2012).

2-1-1- Le stress oxydatif et la peroxydation lipidique (LPO) :

Les acides gras polyinsaturés sont des cibles majeures pour l'oxydation par les ROS, dans un processus appelé peroxydation lipidique (Muriel et Gordillo, 2016). La LPO est un mécanisme fréquemment invoqué dans la destruction des membranes biologiques, la mort cellulaire induite par les ROS et les lésions hépatiques (Salvayre et al, 2010). Les initiateurs communs du processus de peroxydation sont (HO•) et (HOO•). En outre, la LPO peut être causée par le peroxydinitrite (Du et al, 2016).

Le processus global de la peroxydation lipidique comprend trois étapes: initiation, propagation et terminaison (Yin et al, 2011). En initiation, les pro-oxydants extraient l'hydrogène allylique formant le radical lipidique centré sur le carbone (L•) (étape 1). Dans la phase de propagation, le radical lipidique (L•) réagit rapidement avec l'oxygène pour former un radical lipidique peroxyde (LOO•) (étape 2) qui extrait un hydrogène d'une autre molécule lipidique générant un nouveau (L•) (qui continue la réaction en chaîne) et un hydroperoxyde

lipidique (LOOH) (étape 3). Dans la réaction de terminaison, les antioxydants donnent un atome d'hydrogène à l'espèce radicalaire peroxy lipidique (LOO·) entraînant la formation de produits non radicalaires (étape 4) (Michel et al, 2008; Ayala et al, 2014).

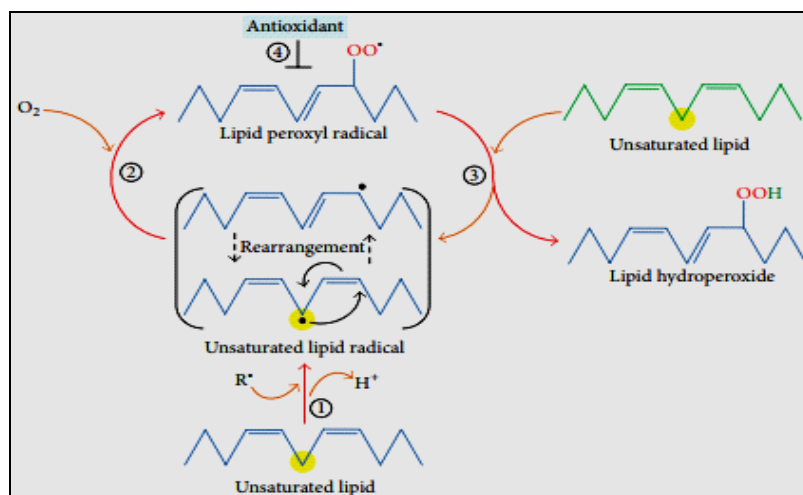


Figure N°13:Processus de peroxydation lipidique (Ayala et al, 2014).

Les produits aldéhydiques produits par la LPO, tels que, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) ont des demi-vies plus longues que les ROS et ont le potentiel de diffuser à partir de leur site d'origine pour atteindre des cibles intra et extracellulaires distantes, amplifiant ainsi les effets du SO (Rolo et al, 2012).

2-1-2- Le stress oxydatif et l'inflammation :

L'exposition continue du foie à certains facteurs tels que les graisses et les métabolites réactifs peut causer une lésion hépatique pouvant entraîner une inflammation. En effet, au cours des dommages du foie, les ROS peuvent induire la génération des gènes pro-inflammatoires, ainsi, la surexpression des gènes pro-inflammatoires provoque une cascade de signalisation intracellulaire qui produit plus de ROS, entraînant un stress oxydatif accru et une lésion inflammatoire favorisant la pathogenèse des maladies hépatiques (Gordillo et al, 2017). D'autre part, des cellules inflammatoires telles que les cellules de Kupffer et neutrophiles peuvent être des sources extracellulaires de formation de ROS au cours d'une réponse inflammatoire (Jaeschke et al, 2002; Andrade et al, 2015). Le SO dérivé de ces cellules entraîne un dysfonctionnement mitochondrial, un stress oxydant mitochondrial et finalement, la mort cellulaire (apoptose/ nécrose) (Jaeschke et al, 2012).

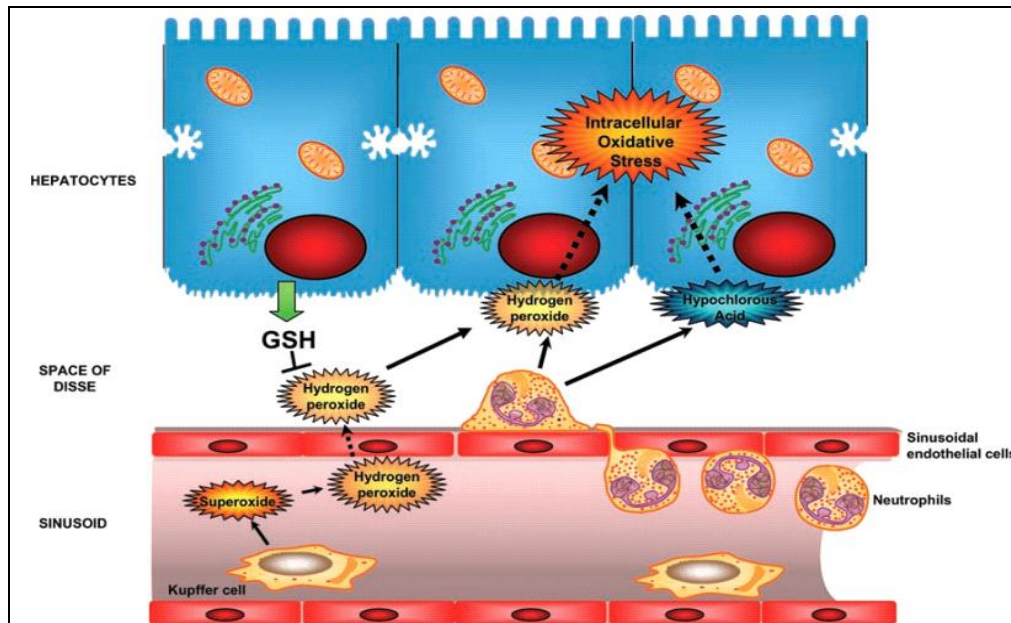


Figure N°14: Génération extracellulaire des ROS par des cellules inflammatoires (Jaeschke et al, 2012).

2-2- L'apoptose et la nécrose :

L'apoptose et la nécrose sont les formes les plus largement reconnues de la mort des hépatocytes (Gu et Manautou, 2013). Chacune de ces voies, que ce soit le stress cellulaire, le dysfonctionnement mitochondrial ou l'activation immunitaire, conduit à la transition de perméabilité mitochondriale (MPT). Le MPT perturbe les membranes mitochondriales en augmentant la perméabilité et l'influx des protons à travers la membrane interne, perturbant ainsi la synthèse de l'ATP. Cette perturbation provoque également une perméabilité accrue de la membrane mitochondriale externe avec libération de cytochrome C dans le cytoplasme de la cellule. Ainsi, la MPT conduit à la nécrose ou à l'apoptose en fonction de la disponibilité de l'ATP (Russmann et al, 2009; Au et al, 2011). (Figure 16)

L'apoptose est une voie ATP-dépendante et ne peut se produire que si le MPT ne se produit pas rapidement et simultanément dans toutes les mitochondries cellulaires. Lorsque l'ATP est présente, le cytochrome C, qui est libéré dans le cytoplasme, forme un apoptosome, qui sert à activer les caspases entraînant une fragmentation cytoplasmique, nucléaire et la formation de corps apoptotiques qui sont éliminés par phagocytose, le processus d'apoptose se produit sans perte d'intégrité de la membrane plasmique, ce qui réduit considérablement l'inflammation causant des dommages secondaires minimes (Ravagnan et al, 2002; Au et al, 2011; Gu et Manautou, 2013; Jayakiran, 2015; Onal et al, 2016) (Figure 16). Cependant,

dans certains troubles hépatiques, l'apoptose élimine un nombre critique d'hépatocytes, entraînant une altération de la fonction hépatique (Andrade et al, 2015).

Contrairement à l'apoptose, la nécrose est développée si le dysfonctionnement mitochondrial est sévère avec une déplétion profonde d'ATP. Elle peut résulter aussi des dommages importants de la membrane plasmique avec perturbation du transport des ions. De plus, elle est caractérisée par la libération du contenu intracellulaire. Le processus de lyse comprend la libération de cytokines, qui peuvent provoquer une réponse inflammatoire et amplifier la blessure aux hépatocytes environnants (Ziegler et Groscurth, 2004; Elmore, 2007; Vanlangenakker et al, 2008; Cho et al, 2009; Au et al, 2011).

De ce fait, la même hépatotoxine peut provoquer l'une ou l'autre, ou même activer concomitamment les deux, selon les circonstances, y compris la vulnérabilité préexistante des hépatocytes et la dose d'hépatotoxine (Formigli et al, 2000; Papucci et al, 2004; Orrenius et al, 2011).

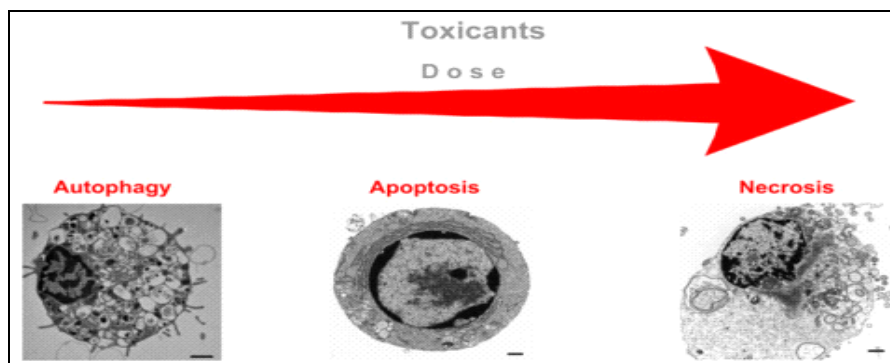


Figure N° 15: La relation entre la dose d'hépatotoxines et les modes de mort cellulaire (Orrenius et al, 2011).

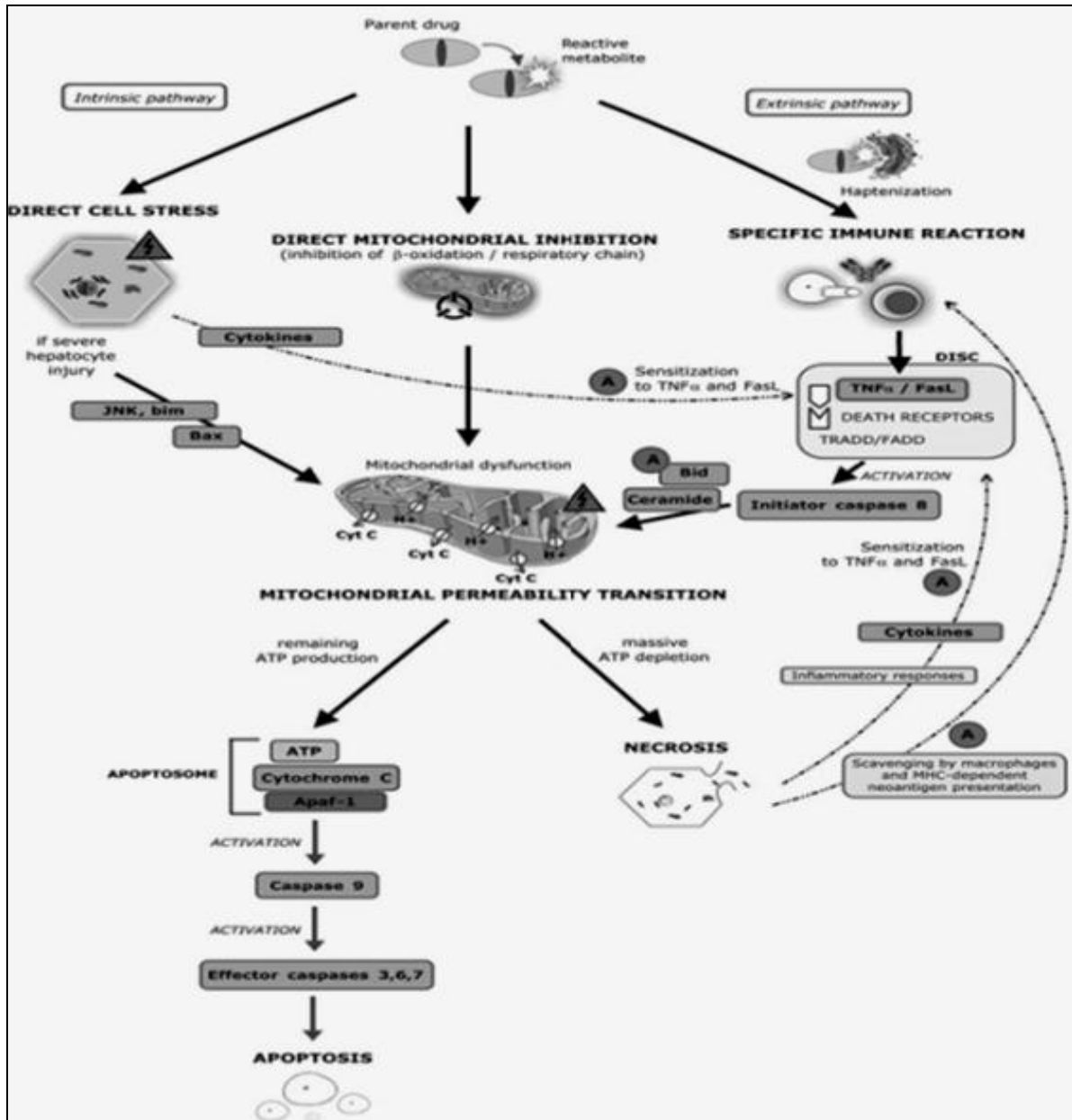


Figure N°16 : Un modèle de trois voies d'hépatotoxicité (Russmann et al, 2009).

LE TÉTRACHLORURE DE CARBONE

III- Le tétrachlorure de carbone (CCL₄) :

1- Définition :

Le tétrachlorure de carbone (CCl₄) est un liquide incolore, ininflammable et volatil, avec une odeur distincte. Au 19^{ème} siècle, il a été utilisé comme anesthésique. Dans les 25 premières années du 20^{ème} siècle sa toxicité était fermement établie (**Pan et al, 2007**). Il est cependant un solvant largement utilisé dans les industries chimiques (**Bona et al, 2012**).

Par ailleurs, le CCl₄ a démontré son utilité en tant que modèle expérimental pour l'étude des lésions hépatiques chez l'homme (**Li et al, 2016**). Il est couramment utilisé pour le criblage de l'activité antihépatotoxique/ hépatoprotectrice des médicaments et des agents hépatoprotecteurs (**Pavanato et al, 2007, Fu et al, 2010**). Ce modèle expérimental a été appliqué dans le monde entier dans plus de 50 000 études jusqu'à présent (**Scholten et al, 2015**).

En principe, l'administration du CCl₄ chez les rongeurs en laboratoire peut être par injection, inhalation ou gavage. La majorité des chercheurs préfèrent l'application par injection (IP) pour raisons de bonne espérance de vie, de performance et de sécurité (**Scholten et al, 2015**).

2- La toxicocinétique :

Le CCl₄ est rapidement absorbé par toute voie d'administration chez l'homme et l'animal. Une fois absorbé, il est largement distribué dans les tissus, en particulier ceux ayant une teneur élevée en lipides. Il est métabolisé par le foie, les poumons et d'autres tissus (**EPA, 2010**). Dans le réticulum endoplasmique, le CCl₄ est rapidement métabolisé par les enzymes du cytochrome p450 (principalement Cyp 2E1) en radical trichlorométhyl (CCl₃•) réactif. Le CCl₃• réagit rapidement avec l'oxygène pour former le radical trichlorométhyl peroxy (CCl₃OO •), hautement réactif (**Ritesh et al, 2015; Lee et al, 2017**). Le tétrachlorure de carbone est rapidement éliminé, principalement dans l'air expiré (**EPA, 2010**).

3- Le mécanisme d'hépatotoxicité :

Le CCl₄ appartient à la classe des hépatotoxines, qui agissent après transformation métabolique (**Ritesh et al, 2015**). L'hépatotoxicité induite par le CCl₄ est supposée impliquer deux phases (**Eidi et al, 2012**), la phase initiale implique, le métabolisme de CCl₄ par le cytochrome P₄₅₀ en radical trichlorométhyl (CCl₃•), qui réagit avec les macromolécules pour

former des adduits à l'ADN, aux protéines et aux lipides (Shankar et al, 2008; Rosa et al, 2010; Xu et al, 2017) suivie d'une série de perturbations biochimiques telles que l'accumulation de triglycérides (Maameri et al, 2015). Le $\text{CCl}_3\bullet$ peut également réagir avec l'oxygène (O_2) pour former un radical très réactive ($\text{CCl}_3\text{OO}\bullet$) qui est plus susceptible que le $\text{CCl}_3\bullet$ d'extraire l'hydrogène des acides gras polyinsaturés (AGPI), ce qui conduit à la peroxydation lipidique (Chao et al, 2013). Par conséquent, les membranaires cellulaires sont détruites (Tan et al, 2016) conduisant à la fuite des enzymes intracellulaires comme l'ALAT et l'ASAT dans la circulation sanguine et à la mort cellulaire (Maameri et al, 2015). La deuxième phase implique l'activation des cellules de Kupffer, probablement par des radicaux libres (Huang et al, 2012). L'activation des KC est accompagnée par la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Kamel et al, 2017).

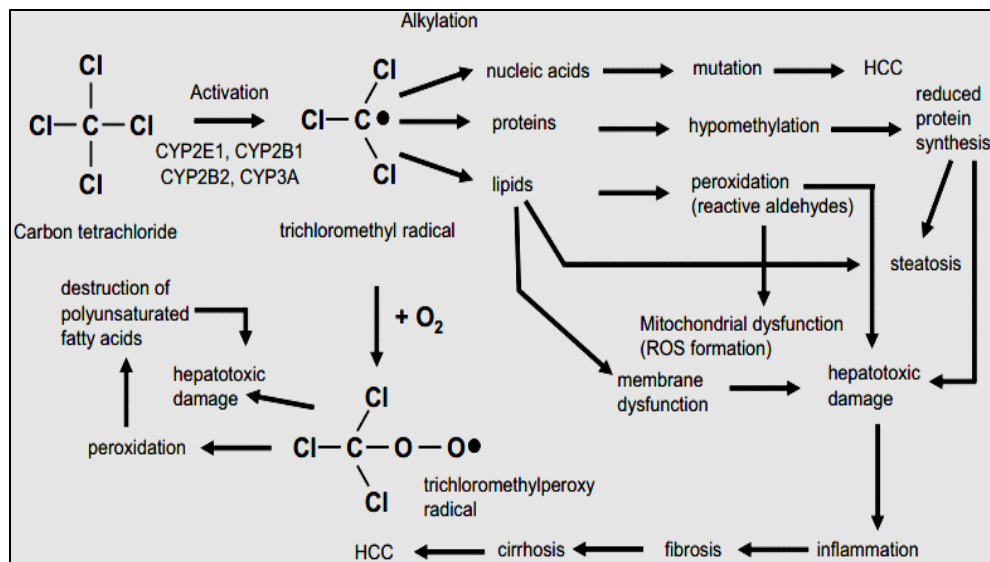


Figure N°17: Séquence chronobiologique d'événements au cours de dommages du foie provoqués par le CCl_4 (Scholten et al, 2015).

Dans l'ensemble, le traitement par le CCl_4 peut entraîner une stéatose, une apoptose, une nécrose centro-lobulaire et une inflammation. Si les dommages dépassent la capacité de réparation du foie, le foie évoluera vers la fibrose, la cirrhose et l'hépatocarcinome (HCC) (Dalton et al, 2009; Bona et al, 2012).

4- La physiopathologie hépatique par le CCl_4 :

Le CCl_4 est l'un des xénobiotiques qui ont été signalés comme agents responsables des lésions tissulaires aiguës et chroniques (Khan et al, 2012). Bien que l'administration d'une dose

unique de CCl_4 puisse induire une nécrose et une stéatose, son administration prolongée entraîne une fibrose hépatique, une cirrhose et un carcinome hépatocellulaire (Choi et al, 2015).

4-1- La stéatose hépatique :

La stéatose hépatique (le foie gras) est caractérisée par un dérèglement lipidique et une accumulation de graisse dans le foie (Liu et al, 2006; Dai et al, 2014). Une caractéristique distinctive de la toxicité par le CCl_4 est l'accumulation rapide de triglycérides (TG_s) dans le foie, similaire aux observations dans le tissu hépatique stéatosique des patients humains (Lee et al, 2011; Dai et al, 2014).

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite vital responsable de la synthèse des protéines (Jo et al, 2013; Li et al, 2017). Les radicaux libres générés à partir du CCl_4 , endommagent le RE, ce qui conduit à une synthèse protéique réduite et à l'accumulation des lipides (Ritesh et al, 2015).

L'ApoB, une apolipoprotéine clé pour le transfert des TG_s (Lee et al, 2017). D'une part (Lee et al, 2011) ont montré dans un modèle de rat (une dose unique de CCl_4 1 mg / kg de poids corporel) que la stéatose hépatique induite par le CCl_4 est liée au stress du RE et à l'activité du cytochrome P450 2E1. Ils ont montré que le CCl_4 injecté peut induire le stress du RE et diminuer la sécrétion de l'ApoB plasmatique et accumuler les TG_s hépatiques. D'autre part et dans un modèle chronique, (0,1 mL / 100 g, de CCl_4 , injectés tous les deux jours pendant 4 semaines), (Lee et al, 2017) ils ont constaté que l'ApoB, a été pliée de manière inefficace et par conséquent, le lipide hépatique s'est accumulé.

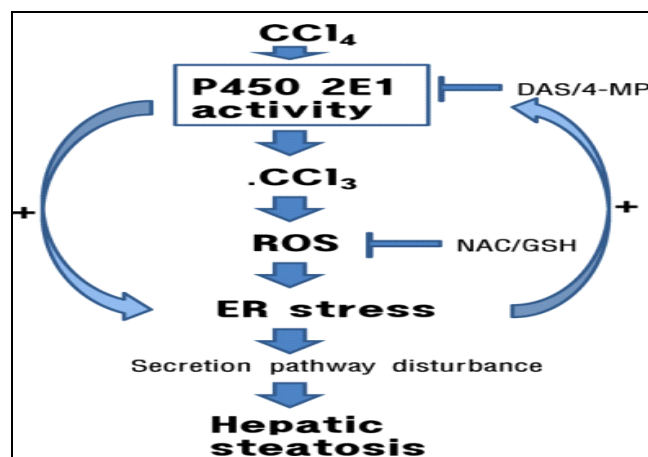


Figure N°18: Schéma de l'implication du stress du RE dans la stéatose hépatique induite par CCl_4 (Lee et al, 2011).

De plus (Pan et al, 2007) ont décrit une autre voie que le CCl_4 emploie pour induire la stéatose, montrant que l'exposition au CCl_4 conduit à une modification covalente de MTP et sa dégradation par les protéasomes. Cela conduit à une augmentation de l'accumulation de triglycérides et de cholestérol dans les tissus.

La MTP (protéine de transfert des triglycérides microsomaux) est un complexe hétérodimère résident dans le RE. Elle assure, dans les tissus de synthèse des lipoprotéines (comme le foie), la formation de la molécule porteuse «la lipoprotéine» recensable de la sécrétion des TG_s en réunissant l'Apo B, sécrétée par le RE, et les triglycérides ou les esters de cholestérol (Améen et Oscarsson, 2003; Hussain et al, 2011).

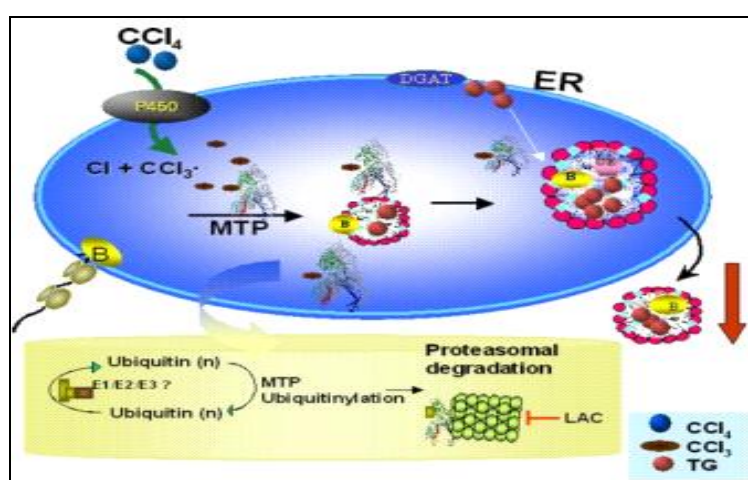


Figure N°19: Un diagramme schématisant le début de la stéatose impliquant la dégradation de la MTP par le CCl_4 (Pan et al, 2007).

Par ailleurs, la stéatose hépatique entraîne une lipotoxicité qui provoque une génération de SO, un dysfonctionnement mitochondrial, une apoptose et une nécrose (Ozturk et al, 2009).

4-2- La nécrose et l'apoptose hépatocytaire :

La nécrose et l'apoptose sont les formes de la mort des hépatocytes dans les lésions hépatiques induites par le CCl_4 , principalement dans la région centro-lobulaire (Tan et al, 2016). En effet la dominance de la nécrose ou de l'apoptose hépatocytaires dans les modèles de lésion hépatique induite par le CCl_4 reste controversée (Guo et al, 2013). Des études antérieures ont montré que le CCl_4 pouvait induire des lésions hépatocytaires aiguës ou chroniques caractérisées par une mort cellulaire nécrotique (Sanmugapriya et Venkataraman, 2006; Eidi et al, 2012; Elgawish et al, 2015), tandis que, d'autres études indiquaient qu'un nombre important d'hépatocytes subissait une apoptose après l'administration de CCl_4 (Yang et al, 2015). Alors que

(Lee et al, 2006; Kuwahata et al, 2012; Guo et al, 2013) ont trouvé à la fois l'apoptose et la nécrose dans le modèle de lésion hépatique chronique induite par le CCl₄.

Pour les lésions hépatiques légères, les hépatocytes régénèrent et remplacent les cellules nécrotiques ou apoptotiques. Ce processus est associé à l'inflammation hépatique, si elle persiste, une atteinte hépatique aiguë peut évoluer vers une atteinte hépatique chronique (Zhang et al, 2017).

4-3- La fibrose hépatique :

La fibrose hépatique (FH) est un processus physiopathologique réversible (Chen et al, 2018). Elle représente la réponse cicatricielle du foie à des lésions répétées ou chroniques et implique une série de types de cellules et de médiateurs (Andrade et al, 2015; Wang et al, 2016).

Des études récentes montrent que la cellule stellaire hépatique (HSC) joue un rôle pivot dans la progression de l'hépatofibrose (Qu et al, 2014). L'activation des HSC est médiée par des ROS et diverses cytokines (Fujii et al, 2010) ainsi que d'autres facteurs libérés des hépatocytes endommagés et des cellules de Kupffer activées (Tan et al, 2016). Les HSC activées se transforment en myofibroblastes (Lee et al, 2014), ces myofibroblastes diminuent leur production de métalloprotéinases matricielles (MMPs), un groupe de peptidases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire, montrant une expression améliorée des inhibiteurs physiologiques des MMPs (TIMP1 et TIMP2) (Schuppan et Afdhal, 2008) et produisent de grandes quantités de composants ECM, tels que le collagène IV, de manière accélérée entraînant une modification fibrotique du foie (Fujii et al, 2010).

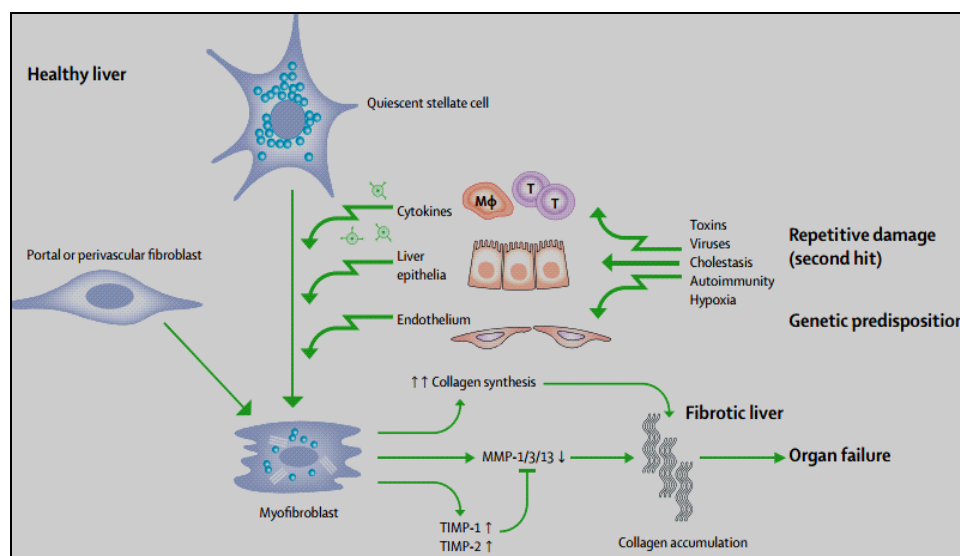


Figure N°20: La fibrogénèse hépatique (Schuppan et Afdhal, 2008).

Le modèle expérimental de traitement au CCl_4 a été largement utilisé pour étudier la fibrogenèse hépatique (Lin et al, 2018), administré de façon répétée, généralement deux fois par semaine (Li et al, 2016; Zhan et al, 2016; Xu et al, 2017; Chen et al, 2018). En effet, la fibrose établie peut être mieux étudiée après 2-4 semaines de traitement par CCl_4 , alors qu'une fibrose sévère peut être observée après 6-8 semaines de traitement (Scholten et al, 2015).

Il est bien connu qu'une fibrose constante peut conduire finalement à une cirrhose du foie (Liu et al, 2006; Kamel et al, 2017).

4-4- La cirrhose hépatique :

La cirrhose est un stade avancé de la fibrose, généralement irréversible, caractérisée par la formation de nodules du parenchyme hépatique séparés par des cloisons fibrotiques (Guyot et al, 2006).

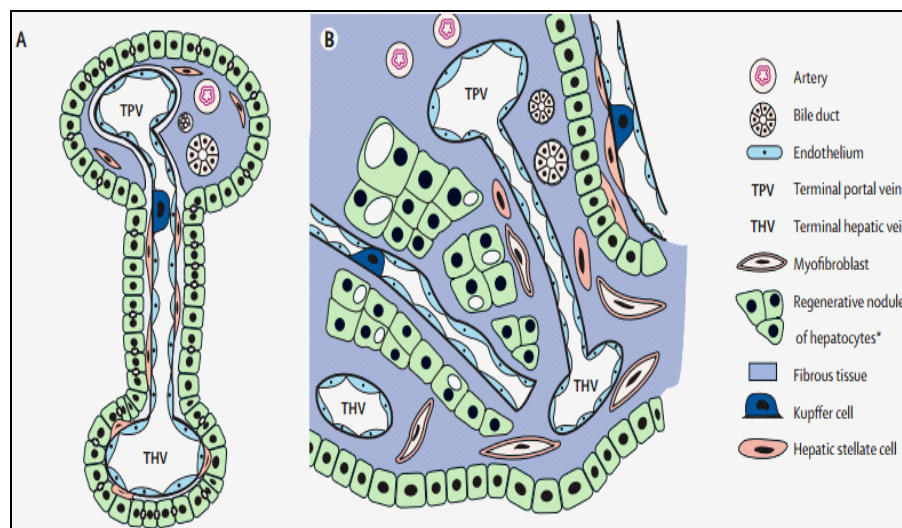


Figure N°21: L'altération architecturale de la cirrhose ((A) foie saint/ (B) Foie cirrhotique) (Schuppan et Afdhal, 2008).

Le développement de la cirrhose est généralement associé au stress oxydatif et à la LPO, ainsi le CCl_4 est largement utilisé pour induire la cirrhose dans des modèles d'animaux (Bona et al, 2012). Le temps suffisant pour développer une cirrhose par l'administration de CCl_4 est variable. Cependant, l'intervalle d'administration du CCl_4 ne doit pas être si long que les cellules endommagées ne peuvent pas régénérer. En général, deux doses par semaine sont recommandées, mais cela peut varier selon le modèle (Pavanato et al, 2007).

LES ANTIOXYDANTS

IV- Les antioxydants :

1- Définition :

Les antioxydants sont des substances capables d'intercepter les radicaux libres générés par le métabolisme cellulaire ou par des sources exogènes (Marcadenti et Coelho, 2015), inhibent ainsi les réactions des radicaux libres et ces dégâts cellulaires (Nimse et Pal, 2015).

2- Classification :

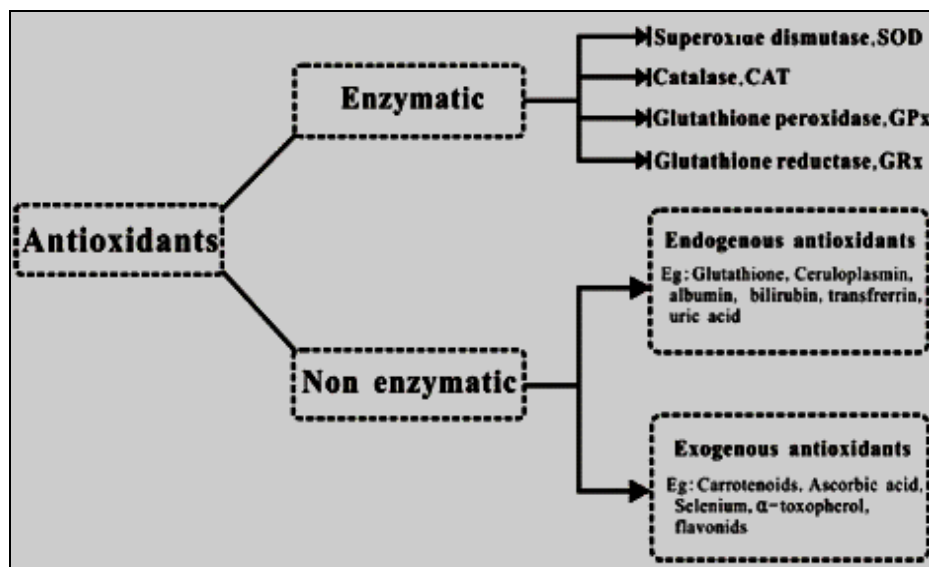
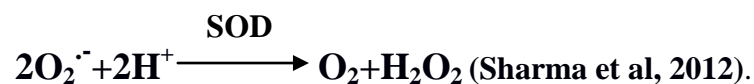


Figure N°22: La classification des antioxydants (Jiao et al, 2016).

2-1- Les antioxydants enzymatiques :

2-1-1- Les superoxydes dismutases :

Le SOD est l'un des antioxydants les plus importants dans l'organisme humain (Shazia et al 2012). Il existe sous formes de Cu/Zn-SOD cytosolique et de Mn-SOD mitochondrial (Castaldo et al, 2016) et il catalyse la dismutation du superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en oxygène moléculaire (O_2) et en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Racchi, 2013).



2-1-2- La catalase :

La catalase est une enzyme antioxydante qui agit comme un catalyseur pour la conversion du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en oxygène et en eau. Ainsi elle annule l'effet du peroxyde d'hydrogène qui est présent dans la cellule (Jevvaet al, 2015).



2-1-3- La glutathion réductase (GR) :

La GR est l'enzyme critique pour la conversion du glutathion oxydé (GSSG) à glutathion réduit (GSH). La GR utilise le NADPH pour réduire un GSSG en deux GSH (Espinosa-Diez et al, 2015).

2-1-4- La glutathion peroxydase (GPx) :

C'est une enzyme sélénodépendante qui protège les cellules en catalysant la réduction des peroxydes et le glutathion réducteur. Le site catalytique enzymatique comprend un résidu sélénocystéine dans lequel le sélénium subit un cycle redox impliquant l'anion sélénoate comme forme active, ce qui réduit les hydroperoxydes (Braverman et al, 2014).

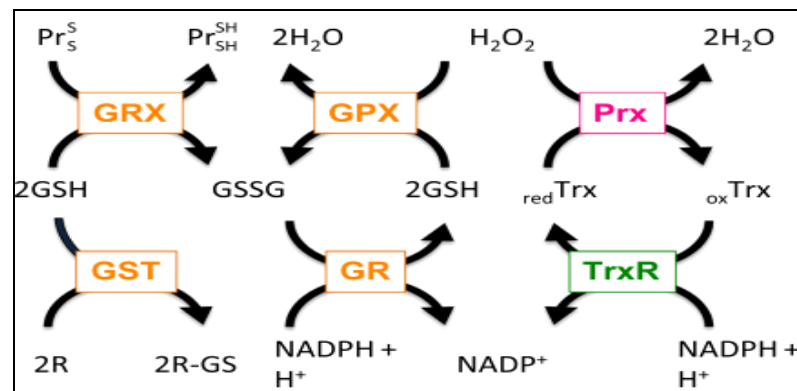


Figure N°23: L'interconnexion de la GR, de GPx et du glutathion (Espinosa-Diez et al, 2015).

2-2- Les antioxydants non enzymatiques :

2-2-1- Le Glutathion «GSH» :

C'est un tripeptide intracellulaire contenant trois acides aminés (L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine). Il a un large éventail de fonction, y compris la désintoxication des xénobiotiques et/ou de leurs métabolites. En outre, il est considéré comme l'antioxydant endogène le plus puissant et le plus important, produit dans le corps humain pour combattre les radicaux (Main et al, 2012; Shazia et al, 2012). Le GSH est recyclé par le glutathion réductase (GR) (Main et al, 2012). (Figure 24)

2-2-2-.La vitamine C «l'acide ascorbique» :

C'est un nutriment requis pour diverses fonctions biologiques, en tant que co-facteurs d'un certain nombre d'enzymes et en tant qu'antioxydant hydrosoluble (**Trabera et Stevens, 2011**). En plus de neutraliser les radicaux libres, la vitamine C agit également dans la régénération de l' α -tocophérol (Vitamine E) (**Marcadenti et Coelho, 2015**).

En outre, il est maintenu dans sa forme réduite, dans la cellule, par la réaction avec le glutathion (**Kabel, 2014**).

2-2-3-.La vitamine E :

C'est une vitamine antioxydante, se divise en plusieurs formes naturelles et synthétiques. Les formes naturelles comprennent l' α -tocophérol, β -tocophérol, γ -tocophérol et δ -tocophérol (**Cook-Mills et Mccary, 2010**). De plus, la vitamine E (α -tocophérol) est l'antioxydant liposoluble le plus important. Elle réagit plus rapidement que les AGP avec les radicaux peroxydes et par conséquent, elle brise la réaction en chaîne de LPO et protège les membranes cellulaires contre l'oxydation (**Kabel, 2014; Kurutas, 2016**). Après réaction avec les radicaux peroxydes, il se forme un radical α -tocophéroxylé (**Raederstorff et al, 2015**), où la régénération du tocophérol oxydé sous sa forme réduite peut être réalisée par l'acide ascorbique ou le GSH (**Sharma et al, 2012**).

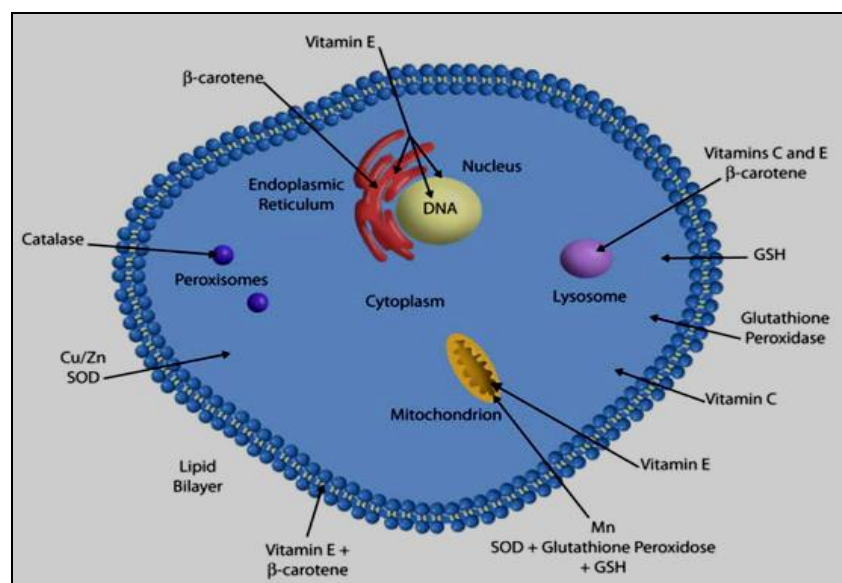
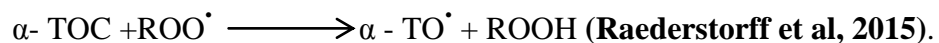


Figure N°24: La localisation des antioxydants au niveau cellulaire (**Mandal, 2012**).

LES FLAVONOÏDES

V- Les flavonoïdes :

1- Définition :

Les flavonoïdes appartiennent à une catégorie des composés polyphénoliques qui sont produits exclusivement dans les plantes. En effet, ce sont des métabolites secondaires abondamment répandus dans tout le règne végétal. En outre, ces composés sont capables de provoquer diverses activités biologiques et pharmacologiques dans les cellules animales (Viskupičová et al, 2008, Alrawaiq et Abdullah, 2014; Huyut et al, 2017).

2- La Structure chimique :

Les flavonoïdes consistent typiquement en un squelette de 15 atomes de carbone composés de deux cycles benzène, que désignent les lettres A et B, fixés par l'intermédiaire d'un cycle pyrane hétérocyclique, que désigne la lettre C, dans un arrangement C6-C3-C6 (Gonzales, 2016).

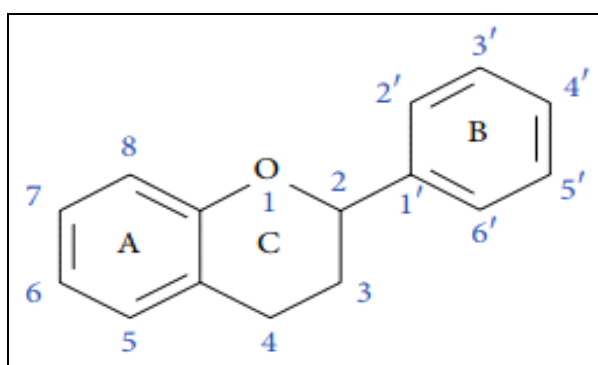


Figure N°25: La structure de base des flavonoïdes (Hung Hung Ha et al, 2015).

3- La classification :

En 1930, une nouvelle substance a été isolée des oranges, à cette époque, on pensait qu'elle faisait partie d'une nouvelle classe de vitamines et a été désignée sous le nom de vitamine P. Plus tard, il est devenu clair que cette substance était un flavonoïde (la rutine) (Kumar et Pandey, 2013). Jusqu'à présent, plus de 9000 flavonoïdes ont été rapporté (Wang et al, 2018) et sont tous caractérisés par leur structure chimique. Selon leur structure, ils pourraient appartenir dans l'un de ces classes: flavones, flavanols, isoflavones, catéchines, anthocyanidines et chalcones (Pal et Verma, 2013). En effet, la présence d'une double liaison, un carbonyle et un groupement hydroxyle dans l'anneau pyranyle C sert de base pour leur classification en plusieurs classes et sous-classes (Gulçin, 2012).

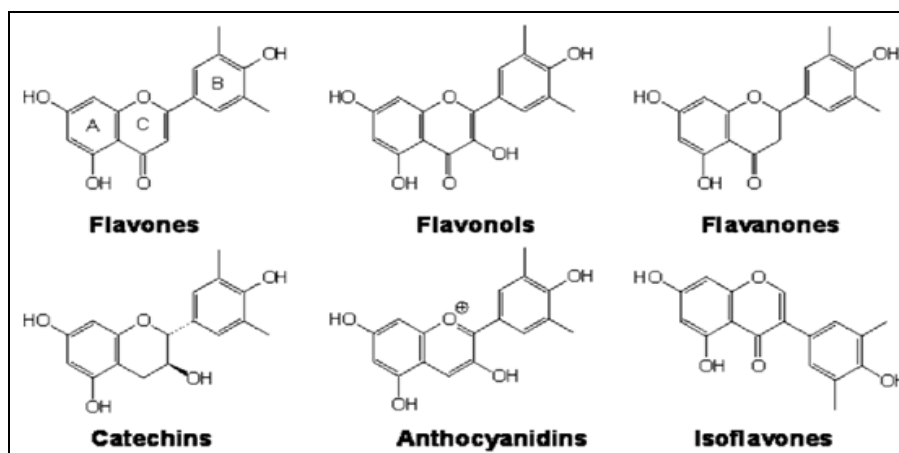


Figure N°26: Les principales classes de flavonoïdes. (La classification est basée sur les variations du noyau C hétérocyclique) (Gross, 2004).

Tableau N°2: Principaux groupes de flavonoïdes, les composés individuels et les sources alimentaires (kambohl et al, 2015)

Flavonoids sub-class	Commonly occurring compound	Main food source
Flavones	Apigenin, Sibelin, Chrysin, Rutin, Luteolin	Apple skins, Berries, Broccoli, Celery, Fruit peels, Cranberries, Grapes, Lettuce, Olives, Onions, Parsley
Flavonols	Isorhamnetin, Kaempferol, Myricetin, Quercetin	Nearly ubiquitous in all plant foods
Flavanones	Hesperetin, Fisetin, Narigin, Narigenin, Taxifolin, Neohesperidin, Neohesperidin	Citrus fruits and tomatoes
Isoflavones	Daidzein, Genistein, glycitein, Biochanin A, Formononetin	Soybean and soy foods
Flavanol	Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin-3-gallate, Epicatechin-3-gallate	Teas, red grapes and red wines
Anthocyanins	Cyanidin, Delphinidin, Petunidin, Pelargonidin, Malvidin, Peonidin	Berries (blueberries, Red grapes, Strawberries)

4- La pharmacocinétique :

Les flavonoïdes peuvent être absorbés par l'intestin grêle ou doivent aller au côlon avant l'absorption. Cela peut dépendre de la structure du flavonoïde (glycoside ou aglycone). En effet, les aglycones peuvent être facilement absorbés par l'intestin grêle, tandis que les glycosides flavonoïdes doivent être convertis en aglycone (Kumar et Pandey, 2013).

Par conséquent, les glycosides flavonoïdes peuvent pénétrer dans les entérocytes où ils sont hydrolysés par une enzyme β -glucosidase cytoplasmique et la lactase phlorizine hydrolase (LPH) située dans la bordure en brosse de l'intestin grêle des mammifères (Németh et al, 2003) pour libérer des aglycones, qui peuvent ensuite diffuser passivement à travers les cellules épithéliales. Une fois dans la cellule, les métabolismes des phases I et II convertissent ces

aglycones en glucuronides, sulfates et méthyl-esters, qui sont ensuite soit libérés dans le sang, soit renvoyés vers la lumière intestinale. Le sang des intestins est ensuite dirigé vers le foie, qui métabolise les flavonoïdes qui ont échappé au métabolisme de premier passage. Par conséquent, les flavonoïdes circulants sont presque exclusivement glucuronides>sulfates>méthyl-esters (dans cet ordre d'abondance) (**Gonzales, 2016**). D'autre part, les flavonoïdes qui sont inabsorbables par l'intestin grêle et les flavonoïdes qui ont été absorbés puis sécrétés par la bile atteindront le côlon (**Hollman, 2004**) où la microflore intestinale a la capacité d'hydrolyser les glycosides flavonoïdes (**Kumar et Pandey, 2013**).

En outre, l'élimination dans la bile est la voie d'élimination la plus importante pour les flavonoïdes (**Viskupičová et al, 2008**). Ils sont éliminés dans les fèces sous forme de glucuro et sulfoconjugués (**Stojko et al, 2015**).

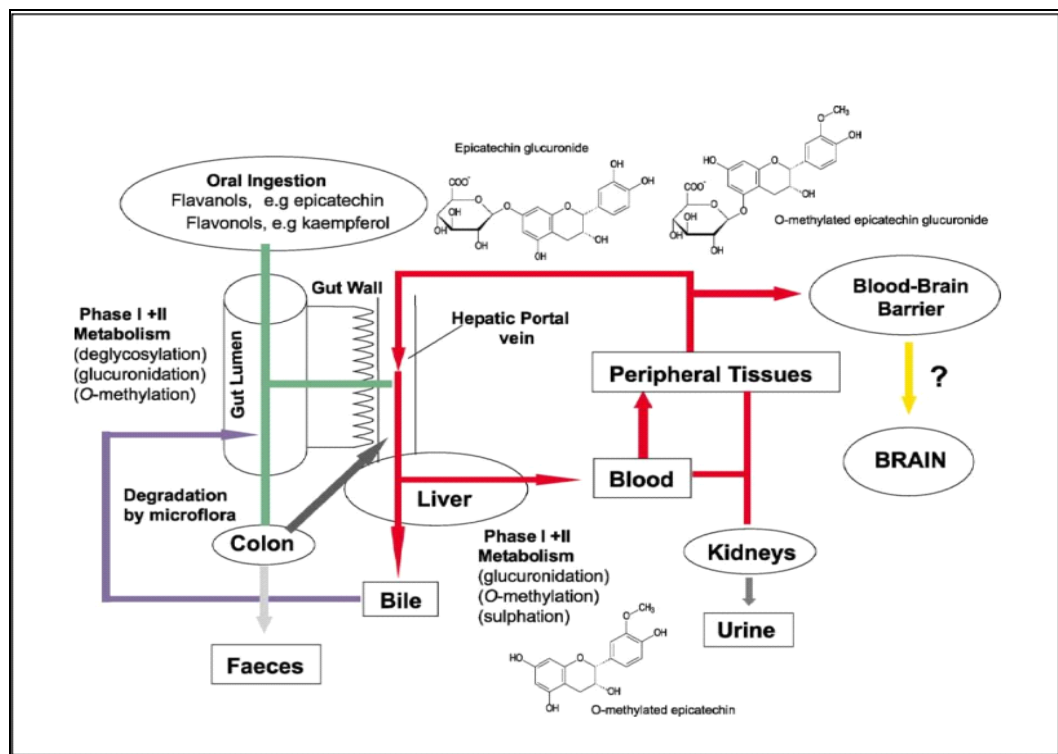


Figure N°27: Métabolisme des flavonoïdes (Stahl et al, 2002).

5.-Les activités biologiques des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont bien connus pour leurs diverses activités biologiques, ayant notamment des effets antioxydants, inhibiteurs de la peroxydation lipidique et des effets anti-inflammatoires (**Hung Hung Ha et al, 2015; Viskupičová et al, 2008**).

5-1- L'activité antioxydante :

La propriété la mieux décrite de presque tous les flavonoïdes est leur activité antioxydante, qui dépasse de loin celle des vitamines antioxydantes bien connues (C et E) et des caroténoïdes dans des études *in vitro* et *in vivo* (Kambohl et al, 2015).

Les flavonoïdes contrôlent l'oxydation au niveau cellulaire en tant qu'antioxydants par divers mécanismes (Dhiman et al, 2012) dont les groupes hydroxyles fonctionnels des flavonoïdes piègent les radicaux libres et / ou chélatent les ions métalliques (Kumar et Pandey, 2013). En effet, les flavonoïdes (Fl-OH) sont capables de réduire les radicaux libres ($R\cdot$) comme les radicaux peroxyde par le transfert des atomes d'hydrogène, cela suscite la formation d'un radical phénoxy flavonoïde (Fl-O \cdot) qui peut réagir avec un second radical ($R\cdot$), acquérant une structure stable (Dhiman et al, 2012). D'autre part, les flavonoïdes peuvent chélater des ions métalliques notamment les ions ferreux (Fe^{2+}) qui sont capables de favoriser la formation de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton (Wang et al, 2018) De plus, les flavonoïdes ont la capacité à activer l'expression des enzymes antioxydantes et à réduire les radicaux alpha-tocophérol (Kambohl et al, 2015).

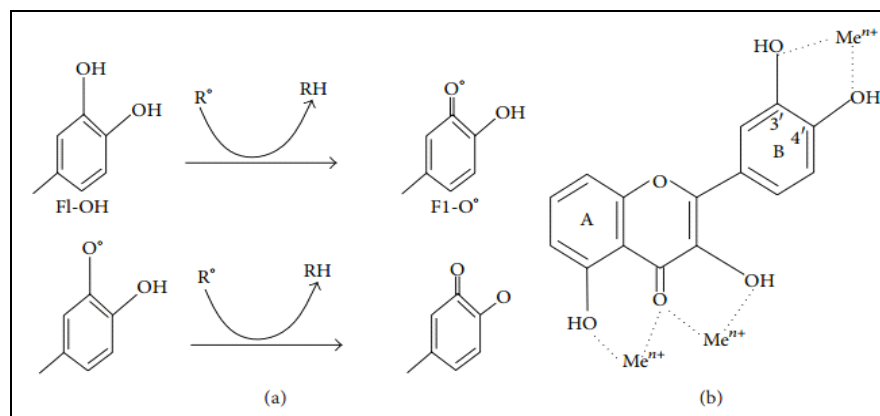


Figure N°28: (a) Le piégeage des ROS ($R\cdot$) par les flavonoïdes (Fl-OH) et (b) des sites de liaison pour les ions métalliques (Pietta, 2000).

5-1-1- La relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes :

Les modifications structurelles des flavonoïdes, par exemple, la sulfatation, la méthylation et la glycosylation changent habituellement leurs activités biologiques (Télés et al, 2018). La disposition des groupes fonctionnels, la substitution et le nombre total de groupes hydroxyle influencent sensiblement l'activité antioxydante des flavonoïdes (Kumar et Pandey, 2013).

Le test a montré que lorsque les groupements hydroxyle sont substitués par un sulfate, l'activité antioxydante a échoué de façon spectaculaire (Téles et al, 2018). Ainsi que la substitution O-méthyle et la présence d'une liaison glycosidique réduit les propriétés antioxydantes des flavonoïdes (Stojko et al, 2015; Wang et al, 2018).

Par ailleurs, pour une activité de piégeage radicalaire maximale, une molécule flavonoïde doit répondre aux critères suivants: une structure 3',4'-dihydroxy dans le cycle B, une double liaison 2,3 en conjonction avec un groupement 4-oxo dans l'anneau C, la présence d'un groupement 3-hydroxyle dans le cycle C et d'un groupe 5-hydroxyle dans le cycle A (Gulçin, 2012).

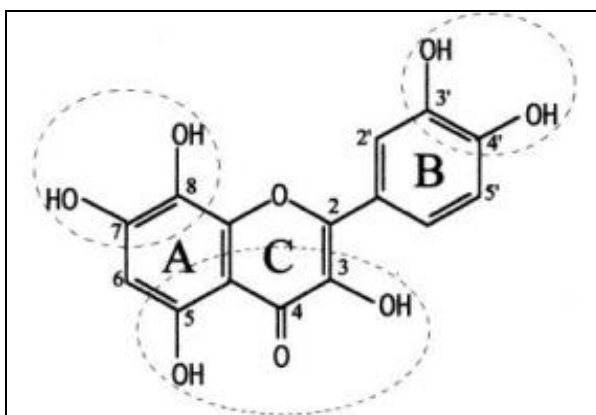


Figure N°29: Les caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une forte activité de piégeage des radicaux libres (Amic et al, 2003).

5-2- L'activité anti-inflammatoire :

La réponse inflammatoire englobe une large activité comprenant une augmentation de la perméabilité capillaire, la libération des cytokines, l'induction de diverses activités enzymatiques (oxygénases, oxyde nitrique synthétase, peroxydases). Ces activités peuvent être diminuées par les flavonoïdes, qui ont un large éventail d'activités anti-inflammatoires (Gross, 2004).

Ils agissent en affectant les systèmes enzymatiques impliqués dans la génération de processus inflammatoires (Tiwari et Husain, 2017) en particulier la tyrosine et les sérine-thréonine protéine kinases, où l'inhibition des kinases est due à la compétitivité liaison des flavonoïdes avec l'ATP aux sites catalytiques sur les enzymes (Kumar et Pandey, 2013). Les flavonoïdes sont capables aussi d'inhiber l'expression des isoformes de la cyclooxygénase, de la lipooxygénase et de l'oxyde nitrique synthase inductible (Tuñón et al, 2009).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I-Matériel et méthodes :

1-Matériel :

1-1-Matériel végétale «*Genista sp*» :

1-1-1-La présentation du genre *Genista* :

Le genre *Genista* est un genre de plantes arbustives de la famille des *Fabaceae* qui constituent l'une des plus grandes familles des plantes à fleurs. Les principaux métabolites secondaires de ce genre sont constitués des alcaloïdes et des flavonoïdes (Wojciechowski et al, 2004; Pistelli et al, 2001).

Régne: *Plantae*

Division: *Magnoliophyta*

Classe: *Rosopsida*

Ordre: *Fabales*

Famille: *Fabaceae*

Genre: *Genista*



1-1-2-L'extraction :

L'extraction de la plante *Genista sp* (extrait butanolique) a été faite au niveau de l'unité de recherche de phytochimie (Professeur **BenayacheFadila**).

1-2-Matériel biologique :

15 rats femelles de souche *Albinos wistar*, pesant 200-270g (au début de l'expérimentation), issue d'un élevage au niveau de l'animalerie de l'université des Frères Mentouri de Constantine. Tous les animaux ont été gardés dans des cages dans les mêmes conditions de température ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) et ont un accès libre à la nourriture et à l'eau potable du robinet servi dans des biberons.

1-3-Réactifs et solvants :

Dosage du MDA :

- L'acide trichloroacétique TCA (25%)
- L'acide thiobarbiturique TBA (0.67%).
- Le n-butanol.

Dosage de la SOD :

- Tris
- Pyrogallol.
- HCl (10 mM).

Dosage du GSH :

- L'acide arichloroacétique TCA (10%)
- Tampon phosphate PBS (0.1 M; PH=8).
- L'acide thionitrobenzoïque DTNB.
- NaCl 0.9%.

1-4-Appareillage :

- pH mètre.
- Spectrophotomètre *Jenway 6300* et *Shimadzu uv.1280*
- Centrifugeuse *Sigma*
- Bain marie GFL.

2-Méthodes :

Les 15 rats sont répartis en 3 lots de 5 rats.

2-1-Prévention et induction de la toxicité :

La substance préventive que nous avons utilisée est l'extrait *n-BuOH Genista sp* à une dose de 200mg/kg et elle est soluble dans l'eau potable du robinet et administré aux rats par gavage pendant 8 jours.

Le produit toxique utilisé pour produire la toxicité expérimentale (l'hépatotoxicité) est le tétrachlorure de carbone (20%) qui est injecté par voie intrapéritonéal (IP) en une seule dose de .2 ml/kg dissous dans l'huile de tournesol.

2-2-Le traitement des animaux :

- **Lot N°01 (Témoin) :** Les rats recevant quotidiennement par gavage de l'eau potable du robinet 4 ml /kg pendant 8 jours, le neuvième jour elles ont reçu par injection (IP) l'huile de tournesol.
- **Lot N°02 (CCl₄) :** Les rats recevant quotidiennement par gavage de l'eau potable du robinet 4 ml/kg pendant 8 jours, le neuvième jour elles ont reçu par injection (IP) 2ml/kg de CCl₄ (20%) à une dose unique.
- **Lot N°03 (Extrait *n*-BuOH *Genista sp* +CCl₄) :** Les rats recevant durant 8 jours par gavage de l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* (200mg /kg) soluble dans l'eau potable du robinet, le neuvième jour elles ont reçu par injection (IP) le CCl₄ (20%) à une dose unique 2ml/kg.

2-3-Prélèvement du sang :

Les rats ont été privés de la nourriture pendant 24h. Le sang est prélevé au niveau de l'œil par ponction dans la veine sinusoïdale à l'aide d'un capillaire, recueilli dans des tubes héparines et laissé dans le réfrigérateur une heure puis centrifugé à 4852 tours/minute pendant 15 minutes. Le plasma est récupéré dans des tubes Eppendorf et conservé à -23 °C pour les dosages biochimiques.

2-4-Récupération du foie :

Après le prélèvement sanguin les rats ont été par la suite sacrifiés par translocation cervicale. Les foies sont perfusés avec de l'eau physiologique saline froide (0.9%) puis récupérés et rincés par la solution saline (0.9%) puis pesés et coupés en fragments. Un petit fragment est conservé dans le formol 10% en vue d'analyse histologique, le reste du foie est conservé dans des tubes sec à -23°C.

2-5-Préparation de l'homogénat et de la fraction cytosolique du foie :

Le jour de dosage, chaque fragment du foie est additionné à la solution tampon tris EDTA (pour un 1g du foie 10ml de Tampon tris EDTA pH=7.6) puis homogénéisé par un homogénéisateur. L'homogénat est ensuite centrifugé à 1000 tours/minute pendant 15 minute à 4°C, le surnagent est récupéré puis centrifugé à 9600 tours/minute pendant 45 minutes à 4°C. La fraction cytosolique est récupérée et utilisée pour les dosages de la concentration du glutathion réduit (GSH) et l'activité de la superoxyde dismutase (SOD).

Pour le dosage du malondialdéhyde (MDA) nous avons homogénéisé un fragment du foie (pour 1g du foie 3ml de KCl 1.15%).

2-6-Dosage des paramètres biochimiques :

Les dosages des différents biomarqueurs de la fonction hépatique ont été réalisés par colorimétrie en utilisant des Kits du commerce sur un automate multiparamétrique.

2-6-1-Dosage des transaminases :

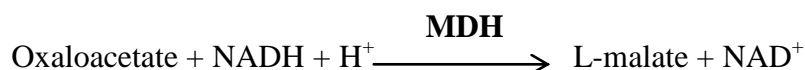
Les transaminases (ou amino transférases) sont des enzymes hépatocytaires dont la fonction est de catalyser des réactions de transfert d'un groupe aminé d'un acide α -aminé à un acide α -cétonique.

Le principe de dosage des transaminases sériques est réalisé selon les réactions suivantes :

- **Pour l'ALT:**



- **Pour l'AST:**



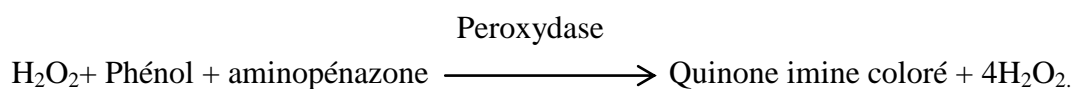
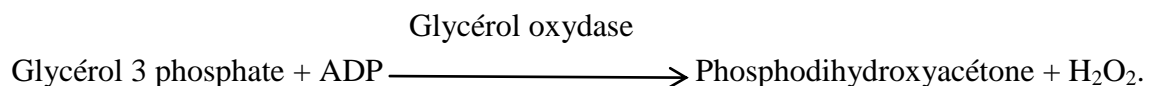
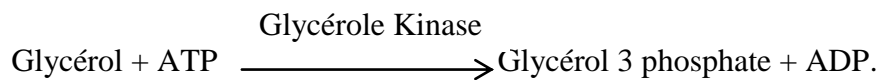
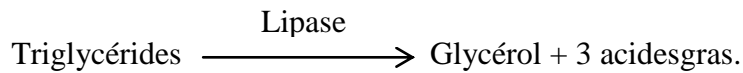
Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'enzyme.

2-6-2-Dosage des triglycérides (TG_s) :

Le principe de dosage repose sur le dosage enzymatique du glycérol libre après action de la lipase.

Les triglycérides sont hydrolysés enzymatiquement par la lipase afin de libérer les AG et le glycérol. Ce dernier est phosphorylé par l'adénosine triphosphate (ATP) et le glycérol Kinase (GK) pour produire du Glycérol-3-phosphate et de l'adénosine diphosphate (ADP). Le Glycérol-

3-phosphate est oxydé en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) par le glycérol phosphate oxydase (GPO) en produisant le (H_2O_2). Lors d'une réaction colorée catalysée par la peroxydase, le (H_2O_2) réagit avec le 4-aminoantipyrine (4-AAP) et le 4-chlorophénol (4-CP) pour produire un colorant rouge selon les réactions suivantes:



L'intensité de la couleur de la quinone imine mesurée à $\lambda=505$ nm est directement proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon.

2-7-Dosage des paramètres de stress oxydatant :

2-7-1-Dosage du malondialdhyde(MDA) :

Le dosage du malondialdhyde (MDA) a été réalisé Selon la méthode d'Ohkawa et al (1979).

-Principe: le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud $100^\circ C$ entre une molécule de MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique TBA d'un pigment de couleur rose ayant une absorbance maximale à 535nm, et extractible par les solvants organiques comme le n-butanol.

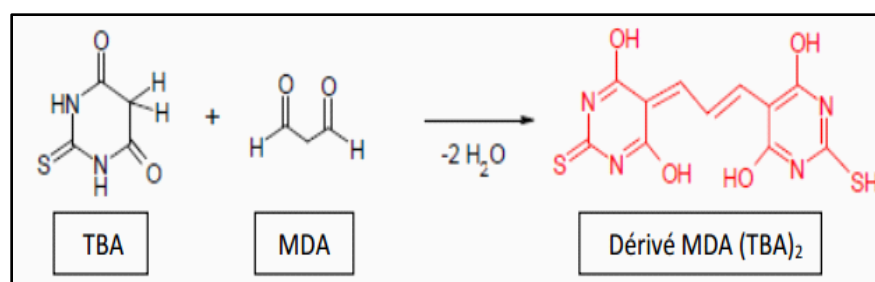


Figure N°30: Le mécanisme de la quantification de la réaction de TBARS (Schaer et al, 2015).

-Mode opératoire: à 0.5ml de l'homogénat additionner 0.5 ml de TCA 25% et 1ml de TBA 0.67%, chauffer le mélange à $100^\circ C$ pendant 45 min, refroidir puis additionner 4ml de n-butanol.

Après centrifuger pendant 10min à 3000tours/min, mesurer la densité optique (DO) sur le surnageant au spectrophotomètre à 535nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

2-7-2- Dosage de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique :

Le dosage de la SOD a été réalisé selon la méthode Marklund et al (1974).

-Principe: Le principe repose sur la capacité d'inhibition de l'autooxydation du pyrogallol par la SOD.

-Mode opératoire: prélever un volume de 10 μ l de l'échantillon, ajouter 2ml de tris HCl et 20 μ l de pyrogallol puis lire la DO à 420nm après 1 min et 3 min. contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

2-7-3-Détermination du taux du glutathion réduit (GSH) :

Le dosage du glutathion a été réalisé selon la méthode de Beutler et al (1963).

-Principe: le principe est basé sur la réaction d'oxydation de GSH par l'acide 5,5dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB). Ce dernier, à pH (8-9) présente une absorbance maximale à 412 nm.

-Mode opératoire: prélever un volume de l'échantillon, puis ajouter la solution TCA et agiter pendant 10 à 15 minutes puis centrifugé 2000tours/minute pendant 5 minutes, ensuite prélever 0.1ml de surnageant et additionner 1.7 ml de BPS (0.1 M, PH=8) et l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB), laisser pendant 5 min à une température ambiante et lire la DO à 412 nm.

2-8-L'étude histologique :

Les petits morceaux du foie ont été mis dans le formaldéhyde 10% à pH 7.4 et stockés pour l'examen histologique. Les biopsies prises des foies ont été incluses dans la Paraffine, coupés (à 5 μ m) puis subis une coloration avec l'hématoxyline- éosine.

2-9-L'étude statistique :

Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne \pm SD. Les comparaisons sont faites par le test «t» de Student. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0.05.

RÉSULTATS

II-Résultats :

II-1-Évaluation de l'activité antioxydante et hepatoprotectrice :

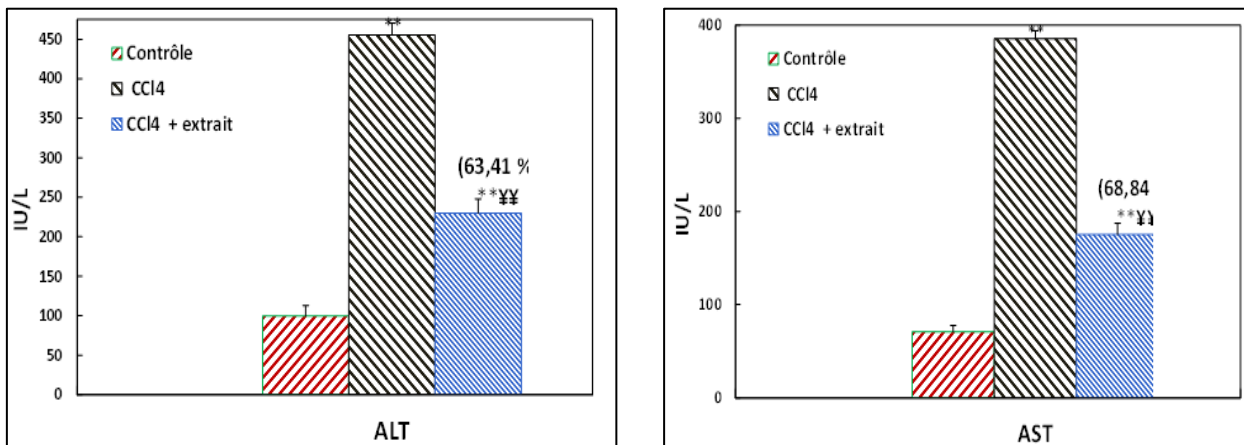


Figure N°31:L'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* (200 mg/Kg) sur le niveau sérique des enzymes ALT et AST des rats traités par le CCl₄ (2 ml/kg).

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=5).

** : comparaison avec le contrôle (*p < 0.05, **p < 0.01).

¥¥ : comparaison avec l'extrait (¥p < 0.05, ¥¥p < 0.01).

Les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

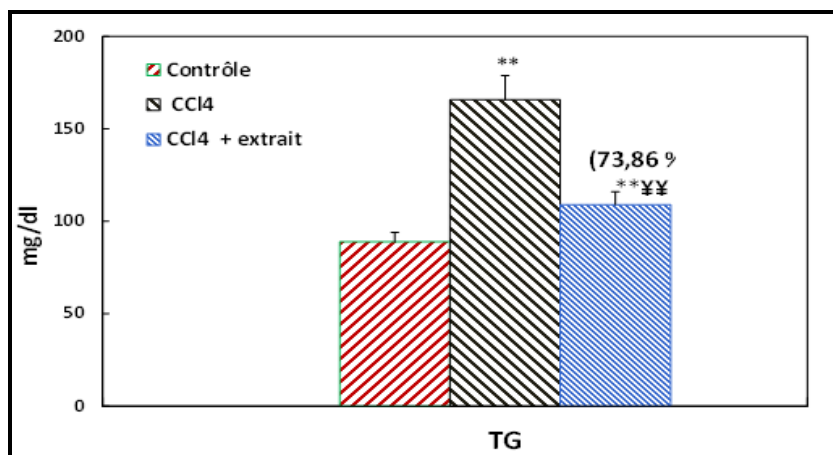


Figure N°32: L'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* (200 mg/Kg) sur le taux des glycérides (TG) sériques des rats traités par le CCl₄ (2ml/kg).

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=5).

** : comparaison avec le contrôle (*p 0.05, **p < 0.01).

¥¥ : comparaison avec l'extrait (¥p<0.05, ¥¥p < 0.01).

Les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

L'hépatotoxicité induite par une seule dose de CCl_4 (2ml/Kg) se manifeste par une augmentation significative ($p < 0.01$) des ALT et AST comparativement aux témoins. L'administration de CCL_4 (2ml/kg) a provoqué chez les rats une augmentation significative ($p < 0.01$) des TG_s en comparaison avec les témoins. L'introduction de l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* (200 mg/Kg) chez les rats a diminué significativement ($p < 0.01$) l'ALT (63.41 %), l'AST (68.84 %) et les TG_s (73.86 %) (Figures N°31-32).

II-2-Evaluation du statut oxydatif :

II-2-1-La peroxydation lipidique :

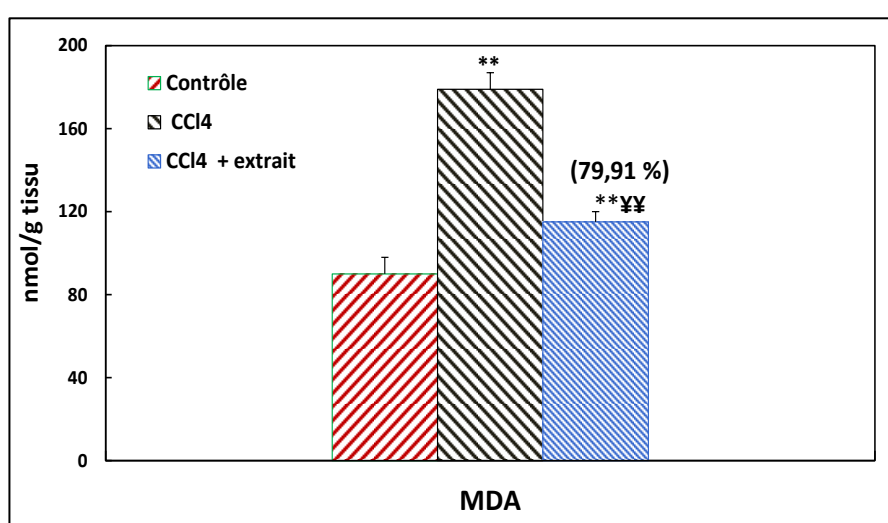


Figure N°33: L'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* (200 mg/kg) sur le taux du MDA chez les rats traités par le CCl_4 (2ml/kg).

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=5).

** : comparaison avec le contrôle (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

¥¥ : comparaison avec l'extrait (¥ $p < 0.05$, ¥¥ $p < 0.01$).

Les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

L'hépatotoxicité provoquée chez les rats traités par le CCl_4 est associée à une peroxydation lipidique exprimée par l'augmentation du taux du MDA. Le gavage des rats par l'extrait *n*-butanolique de *Genista sp* (200 mg/Kg) a inhibé d'une manière hautement significative ($p < 0.01$) la peroxydation lipidique par un taux de 79.91 % (Figure N°33).

II-2-2- Activité enzymatique du SOD et le taux du GSH hépatiques :

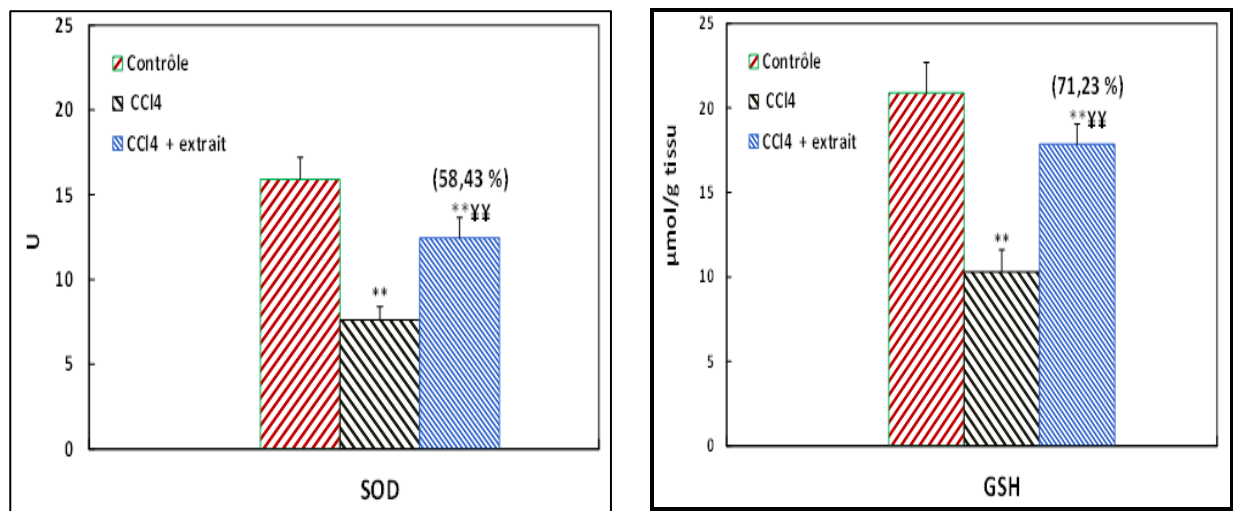


Figure N°34: L'effet protecteur de l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* (200 mg/kg) sur le taux du GSH et l'activité de la SOD chez les rats traités par le CCl₄ (2ml/kg).

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=5).

** : comparaison avec le contrôle (*p < 0.05, **p < 0.01).

¥¥ : comparaison avec l'extrait (¥p < 0.05, ¥¥p < 0.01).

Les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

Le taux du GSH et de la SOD dans le foie des rats recevant le CCl₄ (2ml/kg) a hautement significative diminuée significativement (P<0.01) par rapport aux témoins. La déplétion des deux paramètres étudiés à savoir le GSH et la SOD est restaurée significativement (71.23 % ; 58.43 %; respectivement) (P<0.01) par l'administration de l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* (200 mg/Kg) (Figure N°34).

II-3- Etude histologique :

La figure N°35 montre que les photomicrographies du profil histopathologique du foie des rats traités par le CCl₄ (2ml/Kg) ont manifesté des altérations dans l'histoarchitecture, une dégénérescence cellulaire accompagnée d'une perte de sa configuration, une dilatation des vaisseaux sanguins et l'infiltration des cellules inflammatoires. La présence d'une nécrose centro-lobulaire accompagnée de l'existence de gouttelettes lipidiques reflète une stéatose. Par contre, les lésions observées chez les rats traités par l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* (200 mg/kg) étaient moins sévères et l'architecture hépatique est restée conservée.

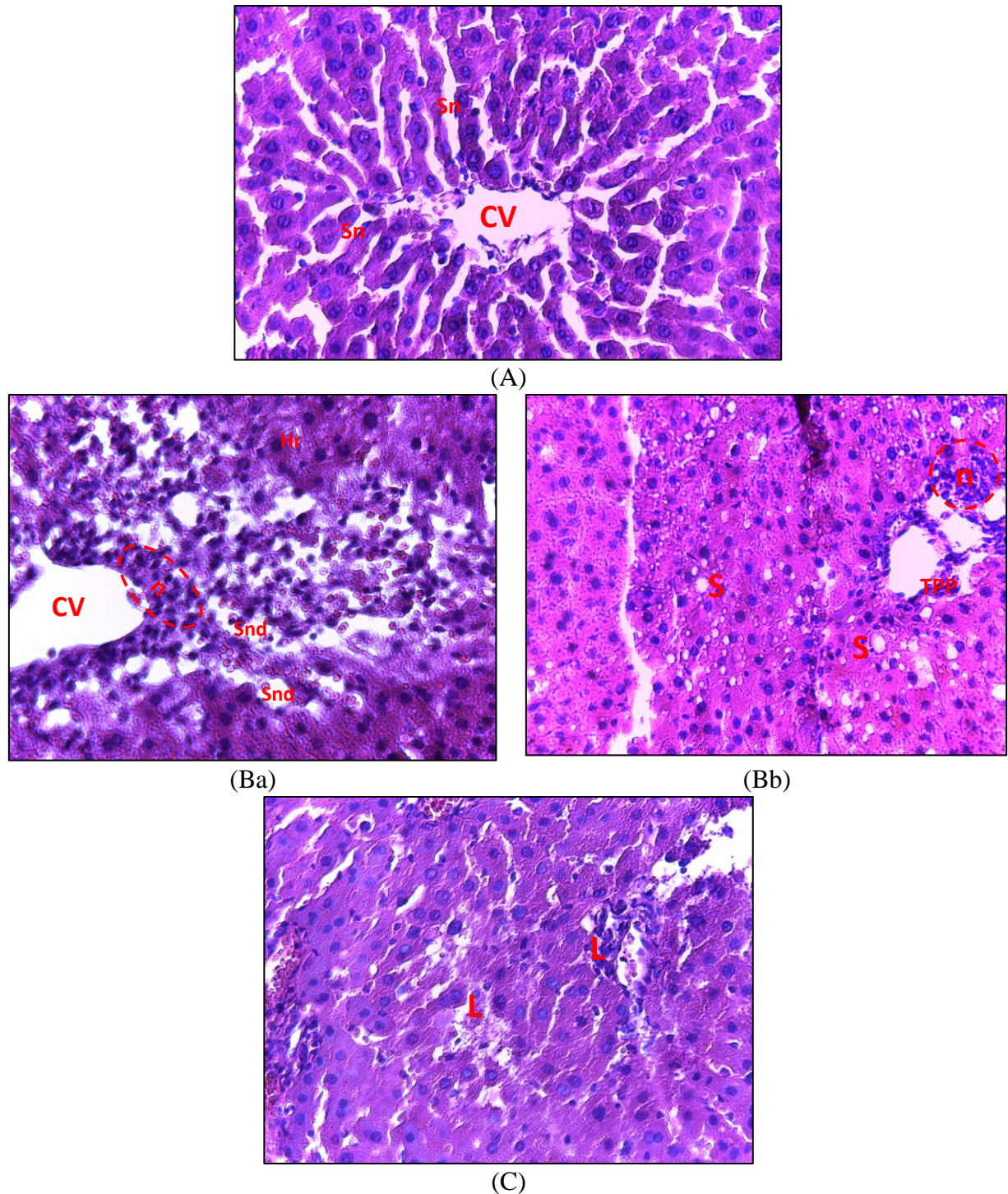


Figure N°35: L'analyse histopathologique

A. Contrôle: hépatocytes normaux avec des espaces sinusoidaux (Sn) veines centrales (CV). (Figure A).

B. Rats traités par le CCl₄: altération de l'architecture hépatique, perte de cordons hépatiques d'agencement radial et dilatations sinusoidales marqués (Snd), degré sévère d'hémorragies (HR), la nécrose centrolobulaire (n) et trépieds portale périphériques(TPP) et présence des gouttelettes lipidiques (S) au niveau du parenchyme (Figures; Ba, Bb).

C. Rats traités par le CCl₄+l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* : l'architecture hépatique a montré une légère dégénérescence (L) avec un degré modéré d'altération histopathologique illustrée. Un degré réduit des dilatations des veines sinusoidales et centrales, un léger ballonnement et nécrose des hépatocytes ont été observés.

DISCUSSION

Discussion :

La présente étude, a pour but d'étudier l'effet de l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* riche en flavonoïdes, chez les rats (200mg/Kg de pds crp), contre l'hépatotoxicité induite par le CCl₄ (une dose unique de 2ml/Kg de pds crp des rats *Albinos wistar*).

En effet, le CCl₄ agit après transformation métabolique et son hépatotoxicité supposée impliquer deux phases (**Ritesh et al, 2015;Eidi et al, 2012**), la phase initiale implique, le métabolisme du CCl₄ par le cytochrome P₄₅₀ en radical trichlorométhyl (CCl₃•), qui se lie par covalence aux macromolécules cellulaires (**Xu et al, 2017**). Le CCl₃• peut également réagir avec l'oxygène (O₂) pour former un radical très réactif c'est le (CCl₃OO•), qui est plus susceptible que CCl₃• d'extraire l'hydrogène des acides gras polyinsaturés (AGPI), ce qui conduit à la peroxydation lipidique (**Chao et al, 2013**). Par conséquent, les structures des membranes cellulaires sont détruites (**Tan et al, 2016**) conduisant à la perte de l'homéostasie cellulaire et à la mort cellulaire (**Maameri et al, 2015**). La deuxième phase implique l'activation des cellules de Kupffer (KC), probablement par des radicaux libres (**Huang et al, 2012**). L'activation des KC est accompagnée par la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Kamel et al, 217**).

Il est généralement accepté que les transaminases (ALT et AST) sont considérées comme des indicateurs les plus sensibles des lésions des hépatocytes (**Lin et al, 2018**). Des études antérieures ont démontré que le CCl₄ augmente les concentrations d'AST et d'ALT sériques (**Chao et al, 2013**). La présente étude a également montré une augmentation significative des transaminases (d'AST et d'ALT) sériques chez les rats traités uniquement par le CCl₄ comparativement aux rats témoins.

Ces transaminases sont normalement localisées dans le cytoplasme des hépatocytes (**Yang et al, 2015**). Les membranes cellulaires riches en graisses insaturées sont très sensibles aux altérations par les radicaux libres qui peuvent être la cause de leur perte d'intégrité fonctionnelle qui est toujours associée à une nécrose hépatocytaire permettant la fuite des enzymes intracellulaires comme les AST et ALT dans la circulation sanguine (**Eidi et al, 2012; Maameri et al, 2015**).

Par ailleurs, les rats traités par le CCl₄ ont connu une augmentation significative du taux de leurs triglycérides par rapport aux rats témoins, ce qui peut contribuer à une stéatose hépatique induite par le CCl₄, qui est caractérisée par une accumulation excessive des

triglycérides dans les hépatocytes (**Dai et al, 2014**). Cela peut être la conséquence de la perturbation du mécanisme de couplage des triglycérides à l'apoprotéine appropriée pour former la molécule porteuse «la lipoprotéine» recensable de la sécrétion des TG_s (**Narasimha et al, 2017**). En effet, le CCl₄ injecté peut induire le stress du RE par ses métabolites réactifs, par conséquent, l'apoB, une apolipoprotéine clé pour le transfert des TG_s, est pliée de manière inefficace ce qui entraîne le blocage de sécrétion des TG_s des hépatocytes causant la stéatose (**Lee et al, 2011; Lee et al, 2017**). D'autre part, l'exposition au CCl₄ peut conduire à une modification covalente de MTP (une protéine résidant dans le RE, qui assure la formation des lipoprotéines en réunissant l'Apo B et les triglycérides) et sa dégradation par les protéasomes, cela conduit à une augmentation du taux des triglycérides (**Pan et al, 2007; Hussain et al, 2011**).

Le stress oxydatif existe lorsqu'il existe un déséquilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants en faveur des pro-oxydants dans la cellule (**Sid et al, 2013**). Plusieurs études suggèrent qu'un mécanisme moléculaire possible impliqué dans l'hépatotoxicité par le CCl₄ est la perturbation de l'équilibre pro-oxydant / antioxydant délicat, qui peut conduire à une lésion hépatique par des dommages oxydatifs (**Yoshioka et al, 2017**).

La lésion oxydative induite par le CCl₄ peut être surveillée chez des animaux expérimentaux en détectant des paramètres du stress oxydatif, tels que MDA, SOD, CAT, GSH et GPx (**Yang et al, 2015**). Dans ce contexte, l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD), le taux du glutathion réduit (GSH) ainsi que le taux du MDA, ont été mesurés dans la présente étude.

Il est bien reconnu que les lésions hépatiques induites par le CCl₄ provoquent une peroxydation lipidique (LPO) (**Zhan et al, 2016**). Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits finaux dans le processus de peroxydation lipidique, qui a été utilisé comme biomarqueur de LPO pendant plusieurs décennies (**Yang et al, 2015**).

Les résultats obtenus dans notre étude révèlent une peroxydation lipidique remarquable, accompagnée d'une augmentation significative de malondialdéhyde. Cela, est dû probablement à la bioactivation métabolique du CCl₄ par le cytochrome P₄₅₀ en radical trichlorométhyle (CCl₃•), ce dernier, génère en présence d'oxygène (O₂) des métabolites hautement réactifs (CCl₃OO•), qui sont plus susceptibles que le CCl₃• d'extraire l'hydrogène des acides gras polyinsaturés (AGPI), ce qui conduit à la peroxydation lipidique (**Chao et al, 2013 ; Xu et al, 2017**). Cette observation suggère que la peroxydation lipidique est un processus précoce dans la lésion hépatique et que

les radicaux libres générés peuvent jouer un rôle dans les dommages ultérieurs, conduisant à la nécrose et l'apoptose (**Dalton et al, 2009**).

Les antioxydants sont des molécules qui inhibent ou limitent les réactions des radicaux libres et leurs dégâts cellulaires (**Nimes et Pal, 2015**).

La SOD est une enzyme antioxydante importante pour stabiliser les réactions oxydatives (**Sannigrahi et al, 2009**). Elle catalyse la dismutation du superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en oxygène moléculaire (O_2) et en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (**Racchi, 2013**).

Dans la présente étude, l'activité du SOD était significativement diminuée dans le foie en réponse au traitement par le CCl_4 seul, conduisant ainsi une augmentation des dommages oxydatifs au foie. La diminution de l'activité du SOD a probablement lieu à la suite de la production de radicaux libres et de l'utilisation excessive de cette enzyme (stress) (**Ozturk et al, 2009; Huang et al, 2012**).

Le glutathion (GSH) est l'un des antioxydants biologiques endogènes non enzymatiques les plus abondants présents dans le foie, impliqué dans la détoxification des xénobiotiques, des espèces réactives de l'oxygène et des peroxydes, il agit également comme un substrat essentiel pour les enzymes antioxydantes, notamment GPx et GST (**Narasimha et al, 2017**). Il a été démontré que l'épuisement du GSH hépatique est associé à une toxicité accrue par les produits chimiques, comme le CCl_4 . (**Laouar et al, 2017**).

Notre étude, a montré une diminution du taux de GSH hépatique observé dans le groupe traité par le CCl_4 par rapport au groupe témoin. Cette diminution, peut être provoquée par la réquisition directe de GSH par le GPx pour piéger la production des radicaux libres formés par le métabolisme du CCl_4 (**Bona et al, 2012**). D'autre part, le GSH est facilement oxydé en disulfure de glutathion (GSSG) par la réaction avec du ROOH ou des composés xénobiotiques, ainsi les radicaux dérivés de CCl_4 peuvent réagir avec les groupes sulfhydryle du GSH en diminuant significativement la teneur totale en GSH réduit (**Yoshioka et al, 2017**). Par ailleurs, le GSH joue un rôle clé dans la détoxification des métabolites toxiques de CCl_4 , de ce fait, les niveaux de GSH sont largement médiés par l'activité de la glutathion-S-transférase, générant des adduits avec les métabolites toxiques de CCl_4 (**Ferreira et al, 2010**). En outre, Il a été démontré que, la consommation de GSH hépatocellulaire est associée à l'initiation de la lésion cellulaire avec la formation de peroxydes lipidiques (**Laouaretal, 2017**).

L'augmentation des transaminases sériques, des TG_s, du MDA et du GSH, et la diminution de l'activité enzymatique de la SOD dans la présente étude, montrent que l'administration d'une dose unique de CCl₄ (20% dans l'huile de tournesol à 2 ml/kg de pds corp par injection IP) induisait une lésion hépatique aiguë significative chez les rats traités par le CCl₄ seul.

Cependant, ces variations ont été améliorées chez les rats prétraités par l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* (200mg/Kg) pendant huit jours et qui s'est traduit par une diminution significative d'AST et d'ALT, des TG_s, du MDA, (63,41%), (68,84), (73,86), (79,91) respectivement et une augmentation significative de l'activité enzymatique de la SOD et du taux de GSH (58,43%), (71,23%) respectivement. Cela a probablement été lié aux activités biologiques des flavonoïdes de l'extrait *n*-BuOH *Genista sp*, notamment les effets antioxydants et inhibiteurs de la peroxydation lipidique (**Hung Hung Ha et al, 2015**).

Plusieurs études ont montré que des substances d'origines végétales ont manifesté une activité antioxydante, empêchant les dégâts causés au foie par le CCl₄ car elles contiennent des piègeurs des radicaux libres comme les flavonoïdes (**Laouar et al, 2017**). En effet, les flavonoïdes (Fl-OH) sont capables de réduire les radicaux libres (R•) comme les radicaux peroxydes par le transfert des atomes d'hydrogène, cela suscite la formation d'un radical phénoxy flavonoïde (Fl-O•) qui peut réagir avec un second radical (R•), acquérant une structure stable (**Dhiman et al, 2012; Kumar et Pandey, 2013**). A cet effet, la diminution du taux de MDA, d'AST et d'ALT et des TG_s et l'augmentation de l'activité de la SOD et du taux de GSH dans la présente étude peut être la conséquence de piégeage des espèces radicalaires générés du métabolisme de CCl₄ notamment le CCl₃OO•, susceptible d'arracher un hydrogène des AGPI, par les flavonoïdes diminuant ainsi ou prévenant la peroxydations lipidique dans les membranes des hépatocytes, la libération des transaminases dans le sang, l'oxydation du GSH, la régénération excessive des radicaux libres, l'utilisation excessive de la SOD et le stress RE. D'autre part les flavonoïdes ont la capacité d'activer l'expression des enzymes antioxydantes (**Kambohl et al, 2015**), ce qui peut être une autre cause de la récupération de l'activité de la SOD dans la présente étude.

Les effets hépatotoxiques aigus induits par l'administration du CCl₄ ont été confirmés histopathologiquement, révélant ainsi des altérations dans l'histo-architecture, une dégénérescence cellulaire accompagnée d'une perte de sa configuration, une dilatation des

vaisseaux sanguins et l'infiltration des cellules inflammatoires. La présence d'une nécrose centro-lobulaire accompagnée de l'existence de gouttelettes lipidiques, reflète une stéatose. En revanche, nos résultats histologiques ont montré que le prétraitement par l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* protège efficacement les rats contre la toxicité hépatique induite par le CCl₄.

Les lésions apparues chez les rats traités avec l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* (200 mg/kg) étaient moins sévères et l'architecture hépatique demeure conservée.

Nos résultats s'avèrent similaires à l'étude menée par **(Dai et al, 2014)** qui a montré que les rats soumis au CCl₄ (0.5ml/Kg deux fois par semaine pendant deux semaines) ont présenté des lésions hépatiques et une augmentation significative des AST et ALT, une diminution des SOD, GSH et des gouttelettes de graisse dans le foie et que le traitement avec des proanthocyanidines (400mg/Kg de pds crp) a efficacement éclipsé les lésions hépatiques, l'accumulation des lipides, et restaurer le taux de GSH et de l'activité des enzymes antioxydants. **(Narasimha et al, 2017)** ont utilisé différentes concentrations (200 et 400 mg / kg) de l'extrait aqueux de graine de *Vigna unguiculata* (AVU) pour évaluer son effet antioxydant et hépatoprotecteur contre les lésions hépatiques de CCl₄ (une dose unique de 3ml/Kg de pds crp) et il a été démontré que l'administration orale d'AVU à 200 et 400 mg / kg inhibent significativement et de manière dose-dépendante l'élévation des taux sériques d'ALT et d'AST et des TG_s et réduisent significativement le stress oxydatif. En récupérant les activités diminuées de SOD, GSH et en réduisant les niveaux de malondialdéhyde dans la lésion hépatique aiguë induite par le CCl₄. **(Chao et al, 2013; Adewale et al, 2014, Yang et al, 2015)** ont également montré que la plante nommée *Mahonia oiwakensis* Hayata endémique du Taiwan, l'extrait aqueux d'écorce de tige de *Xylopi aethiopica* et la procyanidine B₂, respectivement, doués d'une forte activité antioxydante hépato-protectrice contre les lésions hépatiques causées par le CCl₄. Nos résultats histo-pathologiques concordent aussi avec ceux indiqués ci-dessus.

En conclusion, la présente étude démontre que le prétraitement par l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* (200mg / Kg) a permis de protéger les rats contre les lésions hépatiques induites par une dose unique de CCl₄ (2ml/Kg). Ces résultats suggèrent que l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* qui est riche en flavonoïdes présente des effets hépato-protecteurs puissants, et que ces effets peuvent être dus à la fois à l'inhibition de la peroxydation lipidique et à l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes sous l'effet des flavonoïdes.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives :

Cette étude, a révélé l'évidence de l'hépatotoxicité sous l'effet du CCL₄. Cette hépatotoxine agit après transformation métabolique en produisant des radicaux hautement réactifs (CCl₃•, CCl₃OO•) qui sont susceptibles de causer des lésions hépatiques profondes provoquant un déséquilibre dans le statut redox hépatocytaire en faveur des pro-oxydants. En effet, il a été constaté que le système de défense antioxydant endogène a diminué significativement, laissant la place aux prooxydants responsables de la lipopéroxydation et la destruction des structures membranaires. Les hépatocytes une fois lésés libèrent les transaminases (ALT, AST) dans le sang. D'autre part, il a diminué la sécrétion des TG_s hépatiques chez les rats en provoquant une stéatose hépatique.

La présente étude, a démontré que l'extrait *n*-BuOH *Genista* sp était bénéfique dans la prévention des dommages hépatiques induits par le CCl₄, car il a diminué les concentrations d'AST, d'ALT et des TG_s dans le sang et l'augmentation du taux du MDA, et il a restauré l'activité de la SOD et le taux du GSH. Sur le plan histologique il a également montré que cet extrait a réduit l'incidence des lésions hépatiques, comme il a également montré que l'extrait *n*-BuOH *Genista* sp a pu réduire l'incidence de la stéatose hépatique.

Tous ces résultats suggèrent que l'extrait *n*-BuOH *Genista* sp présente effectivement des effets hépatoprotecteurs puissants sur les lésions hépatiques induites par le CCl₄ chez les rats, et que ces effets peuvent être dus à la fois à l'inhibition de la peroxydation lipidique et à l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes par les flavonoïdes.

Ces résultats indiquent que l'extrait *n*-BuOH *Genista* sp peut être utilisé comme un agent efficace pour réduire l'hépatotoxicité induite par le CCL₄. Néanmoins, ce travail reste préliminaire, car d'autres études sont nécessaires pour définir le mécanisme exact qui est derrière les effets révélés.

Cette étude nous a permis d'ouvrir plusieurs perspectives dont les plus importants se résument dans ce qui suit :

- D'évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait *n*-BuOH *Genista* sp.
- D'évaluer l'efficacité de l'extrait pour atténuer les lésions hépatiques chroniques.
- La poursuite de nos investigations aux niveaux moléculaires.
- Ce travail laisse aussi entrevoir d'autres perspectives plus lointaines qui pourraient servir de modèle pour la conception de nouveaux agents pharmacologiques.

RÉSUMÉ

L'effet préventif des flavonoïdes contre l'hépatotoxicité induite par le CCl₄.

Résumé

La présente étude a été entreprise pour étudier l'effet hépatoprotecteur de l'extrait *n*-BuOH *Genista sp*, riche en flavonoïdes, sur les lésions hépatiques induites par le CCl₄. Des rats femelles de souche *Albinos wistar* ont été traités par gavage avec de l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* (200mg/kg) chaque jour pendant huit jours. L'hépatotoxicité a été induite le neuvième jour par l'administration intrapéritonéale d'une dose unique de CCl₄ (20% dans l'huile de tournesol à une dose de 2ml/kg de poids corporel).

L'activité antioxydante et hépatoprotective de l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* a été évaluée en mesurant, les transaminases sériques (AST et ALT), aussi le taux sérique des triglycérides (TG_s), le taux de MDA, l'activité de la SOD et le taux du GSH. Le CCl₄ non seulement a élevé les taux de MDA, d'ALT et d'AST, mais a également réprimé le système de défense antioxydant hépatique, y compris la SOD et le GSH de plus il a diminué la sécrétion des TG_s en augmentant ses taux sérique. Ces variations ont été améliorées après avoir administré l'extrait *n*-BuOH *Genista sp*, qui s'est traduit par une diminution significative des taux d'ALT, d'AST, des TG_s, du MDA, par (63,41%), (68,84%), (73,86), (79,91%) respectivement et l'augmentation significative de l'activité enzymatique de la SOD, du taux de GSH par (58,43%), (71,23%) respectivement. Les observations biochimiques ont été complétées par un examen histopathologique des coupes du foie des rats. L'examen histopathologique du foie a montré que l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* a réduit la dégénérescence cellulaire, l'infiltration des cellules inflammatoire, la nécrose et l'incidence de la stéatose hépatique chez les rats traités par cet extrait butanolique.

Nos résultats suggèrent que l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* riche en flavonoïdes pourrait être un agent hépatoprotecteur efficace et un candidat thérapeutique pour les troubles hépatiques et pour d'autres maladies liées au stress oxydatif.

Mots clés : Extrait *n*-BuOH *Genista sp*; Flavonoïdes, Hépatoprotecteur; Tétrachlorure de Carbone; Hépatotoxicité; Stress oxydatif.

Preventive effect of flavonoids against CCL₄-induced hepatotoxicity

Abstract

This study was undertaken to investigate the hepatoprotective effect of the extract *n*-BuOH *Genista sp* flavonoid-rich on liver injury induced by CCl₄. Female rats of *Albino wistar* strain were treated by gavage with extract of *n*-BuOH *Genista sp* (200mg/kg) every day for eight days. Hepatotoxicity was induced on the ninth day by intraperitoneal administration of a single dose of CCl₄ (20% into sunflower oil at a dose of 2ml / kg body weight).

The antioxidant and hepatoprotective activity of the *n*-BuOH extract of *Genista sp* was assessed by measuring serum transaminases (AST and ALT), serum level of triglycerides (TG_s), and the MDA rate, the activity of SOD and the rate of GSH. The CCl₄ did not only elevate MDA, ALT and AST levels, but also suppressed the hepatic antioxidant defense system, including SOD and GSH in addition decreased TG_s secretion by increasing serum levels. These variations were improved after administering the extract of *n*-BuOH of *Genista sp*, which has resulted in a significant decrease in ALT, AST, TG_s, MDA, by (63,41%), (68,84%), (73,86), (79,91%) respectively, and the significant increase in SOD enzyme activity and GSH by (58,43%), (71,23%) respectively too.

All the above observations were supported by histopathological study of rat liver. Histopathological examination of the liver tissue has showed that the *n*-BuOH extract *Genista sp* had reduced cell degeneration, inflammatory cell infiltration, necrosis and the incidence of hepatic steatosis in rats treated by the *n*-BuOH extract.

Our results suggested that the extract of *n*-BuOH *Genista sp* rich in flavonoids could be an effective hepatoprotective agent and a therapeutic candidate for liver disorders and for other oxidative stress related diseases.

Key words: Extract *n*-BuOH *Genista sp*; Flavonoids, Hepatoprotector; Carbon tetrachloride; hepatotoxicity; Oxidative stress.

دراسة التأثير الوقائي للفلافونويدات ضد السمية الكبدية الناجمة عن CCl_4

ملخص

أجريت هذه الدراسة للتحقق من التأثير الوقائي للمستخلص البيتانولي للنبتة *Genista sp* الغنية بالفلافونويدات ضد السمية الكبد الناجمة عن رباعي كلوريد الكربون CCl_4 . تمت معالجة جرذان إناث من نوع *Albinos wistar* بالمستخلص النباتي البيتانولي (*Genista sp*) (200مغ/كغ) عن طريق التجريع الفموي كل يوم لمدة ثمانية أيام وفي اليوم التاسع تم إستحداث السمية الكبدية عن طريق إعطاء الجرذان حقنة تحت صفاقية لجرعة واحدة من CCl_4 (20% في زيت عباد الشمس) بجرعة 2 ملل / كغ من وزن الجسم. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة و الوقائي للكبد للمستخلص البيتانولي *Genista sp* من خلال قياس مستويات الأنزيمات المصلية (ALT;AST), ثلاثي الجليسيريد (TG), الـMDA والـGSH وأيضاً نشاط الـSOD. CCl_4 لم يرفع من مستوى MDA فقط ولكن كبح أيضاً النظام الكبدى المضاد للأكسدة بما في ذلك SOD و GSH بالإضافة إلى رفع مستويات ALT, AST و TG في مصل الجرذان. تم تحسين هذه المستويات بعد تناول المستخلص البيتانولي *Genista sp* وتمثل ذلك في إنخفاض كبير لكل من ALT, AST وTG بنسبة (63.41%)، (68.84%)، (73.86)، (79.91%) على التوالي و زيادة كبيرة في النشاط الأنزيمي للـSOD و معدل GSH بنسبة (58.43%)، (71.23%) على التوالي. تم التأكد من الملاحظات البيوكيميائية بفحص نسيجي لقطع من كبد الجرذان , أظهر الفحص النسيجي الكبدى أن المستخلص البيتانولي *Genista sp* خفّض من نكرزة الخلايا الكبدية، تسلل الخلايا الإلتهابية و التنكس الدهني الكبدى لدى الجرذان المعالجة بهذا المستخلص البيتانولي.

بينت نتائج هذه الدراسة أن المستخلص البيتانولي *Genista sp* الغني بالفلافونويدات يمكن أن يكون عاملاً وقائياً كبدياً فعالاً ومرشحاً لعلاج الإضطرابات الكبدية وغيرها من الأمراض ذات الصلة بالإجهاد التأكسدي.

الكلمات المفتاحية: المستخلص البيتانولي *Genistat sp*, الفلافونويدات, عامل وقائي كبدى, رباعي كلوريد الكربون, السمية الكبدية, الإجهاد التأكسدي.

RÉFÉRENCES

Références :

A

Adewale O.B; Adekeye A.O; Akintayo C.O; Onikanni A, Sabiu S. Carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic damage in experimental Sprague Dawley rats: Antioxidant potential of *Xylopiya aethiopica*/ *The Journal of Phytopharmacology*; 3(2): 118-123. **2014**.

Adewusi E.A; Afolayan A.J. A review of natural products with hepatoprotective activity/ *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(13), 1318-1334, **2010**. DOI : 10.5897/JMPR09.472.

Almazroo O.A; Miah M.K; Venkataramanan R. Drug Metabolism in the Liver. **2016**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.001>.

Alrawaiq N.S; Abdullah A. A Review of Flavonoid Quercetin: Metabolism, Bioactivity and Antioxidant Properties/ *International Journal of PharmTech*, Vol.6, No.3, pp 933-941. **2014**.

Améen C; Oscarsson J. Sex Difference in Hepatic Microsomal Triglyceride Transfer Protein Expression Is Determined by the Growth Hormone Secretory Pattern in the Rat/ *Endocrinology*, **2003**, 144(9): 3914–3921. Doi : 10.1210/en.2003-0518.

Amić D; Amić D.D; Beslo D; Trinajstić N. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids/ *CroaticaChemica Acta* 76 (1) 55-61. **2003**.

Andrade K.Q; Moura F.A; Santos J.M; Araújo O.R; Santos J.C; Goulart M.O. Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine/ *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16, 30269–30308. Doi :10.3390/ijms161226225.

Au J.S; Navarro V.J; Rossi S. drug-induced liver injury – its pathophysiology and evolving diagnostic tools/ *Aliment Pharmacol Ther* **2011**; 34:11–20. Doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04674.x.

Ayala A; Muñoz M.F; Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal/ *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.**2014**.

B

Bona S; Filippin L.I; Naso F.C.D; David C; Valiatti B et al. Effect of Antioxidant Treatment on Fibrogenesis in Rats with Carbon Tetrachloride-Induced Cirrhosis/ *International Scholarly Research Network ISRN Gastroenterology*. **2012**. Doi :10.5402/2012/762920.

Braverman.S; Cherkinsky M; Kalendar Y; Jana R; Sprecher M; Goldberg I. Synthesis of Water-Soluble Vinyl Selenides and Their High Glutathione Peroxidase (GPx)-Like Antioxidant Activity/ *SYNTHESIS* **2014**, 46, 0119–0125. Doi: 10.1055/s-0033-1338555.

C

Castaldo S.A; Freitas J.R; Conchinha N.V; Madureira P.A. The Tumorigenic Roles of the Cellular REDOX Regulatory Systems/ *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 8413032, **2016**. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8413032>.

Chao J; Liao J.W; Peng W.H; Lee M.S; Pao L.H; Cheng H.Y. Antioxidant, Analgesic, Anti-Inflammatory, and Hepatoprotective Effects of the Ethanol Extract of *Mahonia oiwakensis* Stem/ *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 14, 2928-2945. Doi :10.3390/ijms14022928.

Chen W; Zhang Z ; Yao Z; Wang L; Zhang F et al. Activation of autophagy is required for Oroxylin A to alleviate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and hepatic stellate cell activation/ *International Immunopharmacology* 56 148–155. **2018**.

Chiang J. *Liver Physiology: Metabolism and Detoxification/ Pathobiology of Human Disease*. pp. 1770-1782. **2014**. DOI: 10.1016/B978-0-12-386456-7.04202-7.

Cho Y; Challa S; Moquin D; Genga R; Ray T.D et al. Phosphorylation-Driven Assembly of RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation/ *Cell.*; 137(6): 1112–1123. **2009**. Doi :10.1016/j.cell.2009.05.037.

Choi H.S; Kang J.W; Lee S.M. Melatonin attenuates carbon tetrachloride induced liver fibrosis via inhibition of necroptosis. **2015**..

Cook-Mills J.M; Mccary C.A. Isoforms of Vitamin E Differentially Regulate Inflammation/ *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 10(4): 348–366. **2010**.

D

Dai N; Zou Y; Zhu L; Wang H.F; Dai M.G. Antioxidant Properties of Proanthocyanidins Attenuate Carbon Tetrachloride (CCl₄)–Induced Steatosis and Liver Injury in Rats via CYP2E1 Regulation/ *J Med Food*, 1–7. **2014**. Doi: 10.1089/jmf.2013.2834.

Dalton S.R; Lee S.M.L; King R.N; Nanji A.A; Kharbanda K.K et al. Carbon tetrachloride-induced liver damage in asialoglycoprotein receptor-deficient mice/ *biochemical pharmacology* 77.1283–1290. **2009**. Doi: 10.1016/j.bcp.2008.12.023.

Dhiman A; Nanda A; Ahmad S. A quest for staunch effects of flavonoids: Utopian protection against hepatic ailments/ *Arabian Journal of Chemistry* 9, S1813–S1823. **2012**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.05.001>.

Du K; Ramachandran K; Jaeschke H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential/ *Redox Biology* 10.148–156. **2016**.

E

Eidi A; Mortazavi P; Tehrani M.E; Rohani A.H; Safi S. Hepatoprotective Effects Of Pantothenic Acid On Carbon Tetrachloride-Induced Toxicity In Rats. *EXCLI Journal*; 11:748-759. **2012**.

Elgawish R.A.R; Rahman H.G.A; Abdelrazek H.M.A. Green tea extract attenuates CCl₄-induced hepatic injury in male hamsters via inhibition of lipid peroxidation and p53-mediated apoptosis/ *Toxicology Reports* 2. 1149–1156. **2015**.

Espinosa-Diez C; Miguel.V; Mennerich D; Kietzmann.T; Sánchez- Pérez S; et al. Antioxidant Responses and Cellular Adjustments To Oxidative Stress/ *Redox Biology*. **2015**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.008>.

Elmor S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death/ *Toxicol Pathol*; 35(4): 495–516. **2007**.

EPA. Toxicological Review Of Carbon Tetrachloride (Cas No. 56-23-5). **2010**.

F

Ferreira E.A ; Gris E.F ; Felipe K.B; Correia J.F.G; Ferreira E.C et al. Potent hepatoprotective effect in CCl₄-induced hepatic injury in mice of phloroacetophenone from *Myrcia multiflora*/ *Libyan J Med*, 5: 4891. **2010**. DOI: 10.3402/ljm.v5i0.4891.

Fu W; Chen J; Cai Y; Lei Y; Chen L et al. Antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective potential of the extract from *Parathelypteris nipponica* (Franch. et Sav.) Ching/ *Journal of Ethnopharmacology* 130, 521–528. **2010**. Doi:10.1016/j.jep.2010.05.039.

Fujii T; Fuchs B.C; Yamada S; Lauwers G.Y; Kulu Y et al. Research article Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor/ *BMC Gastroenterology* **2010**, 10:79. .

Fujita T; Narumiya S. Roles of hepatic stellate cells in liver inflammation: a new perspective/ *Fujita and Narumiya Inflammation and Regeneration*. **2016**. Doi: 10.1186/s41232-016-0005-6.

G

Gonzales G.B. In Vitro Bioavailability and Cellular Bioactivity Studies of Flavonoids and Flavonoid-rich Plant Extracts: Questions, Considerations and Future Perspectives/ *Proceeding of the Nutrition Society*, 1-7. **2016**. DOI: 10.1017/S0029665116002858.

Gordillo K.R; Shah R; Muriel P. Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Current and Future Therapy/ *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2017**. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/3140673>.

Gregory SH; Wing EJ. Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections/ *Journal of Leukocyte Biology* Volume 72; 239-248. **2002**.

Gross M. Flavonoids and Cardiovascular Disease/ *Pharmaceutical Biology* **2004**, Vol. 42, Supplement, pp. 21–35. DOI: 10.1080/13880200490893483.

Gu X; Manautou J.E. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury/ *Expert Rev Mol Med.*; 14: e4. **2013**. Doi: 10.1017/S1462399411002110.

Guéguen Y; Mouzat k; Ferrari L; Tissandie E; Lobaccaro J.M.A et al. .Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique/ *Ann Biol Clin*; 64 (6): 535-48. **2006**. Doi: 10.1684/abc.2006.0015.

Gülçin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview/ *Arch Toxicol.* 86:345–391. **2012**. Doi: 10.1007/s00204-011-0774-2.

Gunawan B; Kaplowitz N. Clinical Perspectives on Xenobiotic-Induced Hepatotoxicity/ *Drug Metabolism Reviews* Vol. 36, No. 2, pp. 301–312, **2004**. DOI: 10.1081/DMR-120034148.

Guo X.L; Liang B; Wang X.W; Fan F.G; Jin J et al. Glycyrrhizic acid attenuates CCl4-induced hepatocyte apoptosis in rats via a p53-mediated pathway/ *World J Gastroenterol*; 19(24): 3781-3791. **2013**. Doi: 10.3748/wjg.v19.i24.3781.

Guyot C; Lepreux S; Combe C; Doudnikoff E; Sage P.B et al. Hepatic fibrosis and cirrhosis: The (myo) fibroblastic cell subpopulations involved/ *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38.135–151. **2006**. Doi: 10.1016/j.biocel.2005.08.021.

H

Hollman P.C. Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids/ *Pharmaceutical Biology*, Vol. 42, 74–83. **2004**. DOI: 10.1080=13880200490893492.

Horn F; Lindenmeier G; Grillhösl C; Moc I; Bergchold S et al. *Biochimie Humaine. Médecine-Sciences Flammarion.* **2003**.

Huang G.J; Deng J.S; Chiu C.S; Liao J.C; Hsieh W.T. Hispolon Protects against Acute Liver Damage in the Rat by Inhibiting Lipid Peroxidation, Proinflammatory Cytokine, and Oxidative Stress and Downregulating the Expressions of iNOS, COX-2, and MMP-9/ *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*; **2012**. Doi:10.1155/2012/480714.

Hung Hung Ha C; Fatima A; Gaurav A. In Silico Investigation of Flavonoids as Potential Trypanosomal Nucleoside Hydrolase Inhibitors/ *Advances in Bioinformatics*, Article ID 826047, **2015**. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/826047>.

Hussain M; Nijstad N; Franceschini L. Regulation of microsomal triglyceride transfer protein/ *Clin. Lipidol* 6(3), 293–303. **2011**.

Huyut Z; Beydemir F; Gülçin E. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds/ *Biochemistry Research International*, Article ID 7616791, **2017**. <https://doi.org/10.1155/2017/7616791>.

I

- Ishibashi H; Nakamura M; Komori A; Migita K; Shimoda S.** Liver architecture, cell function, and disease/ *Semin Immunopathol*, 31:399–409. **2009**. .Doi: 10.1007/s00281-009-0155-6.
- Isin E.M; Guengerich F.P.** Substrate Binding to Cytochromes P450/ *Anal Bioanal Chem*; 392(6): 1019–1030. **2008**. Doi: 10.1007/s00216-008-2244-0.
- Iyanagi T.** Molecular Mechanism of Phase I and Phase II Drug-Metabolizing Enzymes: Implications for Detoxification/ *International Review of Cytology*, Vol. 260; 35-112. **2007**. DOI: 10.1016/S0074-7696(06)60002-8.

J

- Jadeja R.N; Devkar R.V; Nammi S.** Oxidative Stress in Liver Diseases: Pathogenesis, Prevention, and Therapeutics/ *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2017**.
- Jaeschke H; Gores G.J; Cederbaum A.I; Hinson J.A; Pessayre D; Lemasters J.J.** Mechanisms of Hepatotoxicity/ *Toxicologie Science* 65,166 –176. **2002**.
- Jaeschke H; McGill M.R; Ramachandran A.** Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity/ *Drug Metabolism Reviews*, 44(1): 88–106. **2012**.Doi:10.3109/03602532.2011.602688.
- Jancova P; Anzenbacher P; Anzenbacherova E.** Phase II drug metabolizing enzymes/ *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*; 154(2):103–116 **2010**.
- Jayakiran M.** Apoptosis-Biochemistry: A Mini Review/ *Jayakiran, J Clin Exp Pathol*, 5:1. **2015**. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0681.1000205>.
- Jeeva J.S; Sunitha J; Ananthalakshmi R; Rajkumari S; Ramesh M; KrishnanR.** Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases/ *J Pharm Bioallied Sci*. **2015**. Doi : 10.4103/0975-7406.163438.
- Jiao K.L; Liu X; Shen L; Zeng W; Qiu G.** Polyphénols Végétaux naturels Pour Atténuer Les dommages Oxydatifs Chez L'homme/ *Etat Actuel et Aerspectives D'avenir*, 15 (5): 1089-1098..**2016**. Doi:<http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v15i5.27>.
- Jo H; Choe S.S; Shin K.C; Jang H; Lee J.H et al.** Endoplasmic Reticulum Stress Induces Hepatic Steatosis via Increased Expression of the Hepatic Very Low-Density Lipoprotein Receptor/ *Hepatology*, Vol. 57, No. 4, **2013**. Doi: 10.1002/hep.26126.

K

- Kabel A.M.** Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition/ *World Journal of Nutrition and Health*, Vol. 2, No. 3, 35-38. **2014**. Doi :10.12691/jnh-2-3-2.

Kambohl A.A; ArAin M.A; MughAl M.J; Zaman A; Arain Z.M; Soomro A.H. Flavonoids: Health Promoting Phytochemicals for Animal Production-a Review/J. Anim. Health Prod. 3(1): 6-13, **2015**. doi: <http://dx.doi.org/10.14737/journal.jahp/2015/3.1.6.13>.

Kamel I.S; El- Sherbini E.S; Hassan H.A; ElGhareeb M.S. Biochemical Studies On Hepatocellular Carcinoma In Male Rats: The Protective Role Of Purslane Seeds Extract/ World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Vol 6, Issue 9, 41-56. **2017**. DOI: 10.20959/wjpps20179-9926.

Kehrer J.P; Klotz L.O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health/ Critical Reviews in toxicology. **2015**, 765–798.

Khan R.A; Khan M.R; Sahreen S. CCl₄-induced hepatotoxicity: protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat/ BMC Complementary and Alternative Medicine, 12:178. **2012**

Kuwahataa M ; Kubota H; Kanouchi H; Ito S; Ogawa A et al. Supplementation with branched-chain amino acids attenuates hepatic apoptosis in rats with chronic liver disease/ Nutrition Research 32:522–529. **2012**. Doi :10.1016/j.nutres.2012.06.007.

Kietzmann T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited/Redox Biology 11; 622–630. **2017**.<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.012>.

Krishna M; D. M. Microscopic Anatomy of the Liver/Clinical Liver Disease,Vol. 2, No. S1. **2013**. Doi: 10.1002/cld.147.

Kumar S; Pandey A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview/ The Scientific World Journal, Article ID 162750, **2013**. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>.

KurutasE.B. The Importance of Antioxidants which Play The Role In Cellular Response Against Oxidative/ Nitrosative Stress: current state/ Kurutas Nutrition Journal 15:71. **2016**. Doi: 10.1186/s12937-016-0186-5.

L

Lach H.C; Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases/ World J Gastroenterol; 20(25): 8082-8091. **2014**. Doi: 10.3748/wjg.v20.i25.8082.

Laouar A; Klibet F; Bourogaa E; Benamara A; Boumendjel A. Potential Antioxidant Properties and Hepatoprotective Effects of Juniperus phoeniceaberries Against CCl₄ Induced Hepatic Damage in Rats/ Asian Pacific Journal of Tropical Medicine; 10(3): 263–269.**2017**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.03.005>.

Larrey D. Drug-induced liver diseases/ Journal of Hepatology ; 32 (1): 77-88. **2000**.

LeCluyse E.L;Witek R.P; Andersen M.E; Powers M.J.Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing/Critical Reviews in Toxicology; 42(6): 501–548. **2012**.Doi: 10.3109/10408444.2012.682115.

Lecomte T; Puig P.L; Lorient M.A. Pharmacogénétique en hépato-gastroentérologie/ Hépato-Gastro, vol. 13, n°4. **2006**.

Lee G.H; Bhandary B; Lee E.M; Park J.K; Jeong K.S et al. The roles of ER stress and P450 2E1 in CCl₄-induced steatosis/ The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 43 1469– 1482.**2011**. Doi :10.1016/j.biocel.2011.06.010.

Lee H.Y; Kim S.W; Lee G.H; Choi M.K; Chung H.W. Curcumin and Curcuma longa L. extract ameliorate lipid accumulation through the regulation of the endoplasmic reticulum redox and ER stress/ Scientific Reports |7:6513|. **2017**. Doi :10.1038/s41598-017-06872-y.

Lee S.J; Kim K.H; Park K.K. Mechanisms of fibrogenesis in liver cirrhosis: The molecular aspects of epithelial-mesenchymal transition/ World J Hepatol; 6(4): 207-216 **2014**. Doi: 10.4254/wjh.v6.i4.207.

Lee T.Y; Chang H.H; Wang G.J; Chiu J.H; Yang Y.Y; Lin H.C. Water-soluble extract of *Salvia miltiorrhiza* ameliorates carbon tetrachloride-mediated hepatic apoptosis in rats/ JPP, 58: 659–665**2006**. Doi: 10.1211/jpp.58.5.0011.

Li C; Miao X; Li F; Wang S; Liu Q; Wang Y; Sun J. Oxidative Stress-Related Mechanisms and Antioxidant Therapy in Diabetic Retinopathy/ Oxidative Medicine and Cellular Longevity. **2017**.

Li S; Tan H.Y; Wang N; Zhang Z.J; Lao L; Wong C.W; Feng Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases/ Int. J. Mol. Sci,16, 26087–26124;**2015**. Doi: 10.3390/ijms161125942.

Li Z; Wei W; Chen B; Cai G, Li X. The Effect of rhCygb on CCl₄-Induced Hepatic Fibrogenesis in Rat/ Scientific Reports| 6:23508 |. **2016**. Doi: 10.1038/srep23508.

Lin Y; Luo H; Wang X; Zheng M; Jin Q et al. Flavanones from *Sedum sarmentosum* Bunge Alleviate CCl₄-Induced Liver Fibrosis in Rats by Targeting TGF- β 1/T β R/Smad Pathway In Turn Inhibiting Epithelial Mesenchymal Transition/ Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, **2018**.

Liu J.Y; Chen C.C; Wang W.H; Hsu J.D; Yang M.Y; Wang C.J. The protective effects of *Hibiscus sabdariffa* extract on CCl₄-induced liver fibrosis in rats/ Food and Chemical Toxicology 44, 336–343. **2006**. Doi :10.1016/j.fct.2005.08.003.

M

Maameri Z; Djerrou Z; Halmi S; Djaalab H; Riachi F; Hamdipacha Y. Evaluation of Hepatoprotective Effect of *Pistacia lentiscus* L. Fatty Oil in Rats Intoxicated by Carbon Tetrachloride/ International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research; 7(2); 251-254. **2015**.

Main P; Angley M; Doherty C; Thomas P; Fenech M. The Potential Role of The Antioxidant and Detoxification Properties of Glutathione In Autism Spectrum Disorders: a systematic review

and meta-analysis/ Nutrition & Metabolism, 9:35. 2012.
<http://www.nutritionandmetabolism.com/content/9/1/35>

Malarkey D.E; Johnson K; Ryan L; Boorman G; Maronpot R.R. New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology/ Toxicologic Pathology, 33:27–34. 2005; Doi: 10.1080/01926230590881826.

Mandal M.A. Systèmes Antioxydants d'Enzymes/ DM.News-Medical.net-An Azo Network Site.Owned and operated by AZoNetwork .2012.

Marcadenti A; Coelho R.C. Dietary Antioxidant and Oxidative Stress: Interaction Between Vitamins and Genetics/ J Nutrition Health Food Sci 3(1): 1-7. 2015.Do: <http://dx.doi.org/10.15226/jnhfs.2015.00138>.

Michel F; Rousselot D.B; Mas E; Draï J; Théron P. Biomarqueurs De La peroxydation Lipidique : aspects analytiques/ Ann Biol Clin; 66 (6) : 605-20. 2008. Doi : 10.1 684/abc.2008.0283.

Mir A; Anjum F; Riaz N; Iqbal H; Wahedi H.M et al. Carbon Tetrachloride (CCl₄) - Induced Hepatotoxicity in Rats: Curative Role of Solanum nigrum/ Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(23), 2525-2532, 2010. Doi: 10.5897/JMPR10.482.

Muriel P; Gordillo K.R. Role of Oxidative Stress in Liver Health and Disease/ Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Arcitle ID 9037051. 2016.
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/9037051.51-254>.

N

Narasimha K.G; Chitikela P.P; Dhanunjaya S; Dayanand R.G; Yuvasree A et al. Hepatoprotective And In Vivo Antioxidant Potential Of Aqueous Seed Extract Of Vigna Unguiculata Against Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity In Rats/ Int. Res. J. Pharm., 8 (1). 2017.Do: 10.7897/2230-8407.080115.

Németh K; Plumb G.W; Berrin J.G; Juge N; JacobR et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans/ Eur J Nutr 42 : 29–42. 2003. Doi: 10.1007/s00394-003-0397-3.

Nimse S.B; PalD. Free Radicals, Natural Antioxidants and Their Reaction Mechanisms/ J Royal Society of Chemistry, 5, 27986–28006. 2015. Doi: 10.1039/c4ra13315c.

O

Onal M; Ovet G; Onal O. Review of Apoptosis/ MOJ Immunol 3(1). 2016. Doi: 10.15406/moji.2016.03.00073.

Orrenius S; Nicotera P; Zhivotovsky B. Cell Death Mechanisms and Their Implications in Toxicology/ Toxicological Sciences 119(1), 3–19 .2011. Doi:10.1093/toxsci/kfq268.

Ozturk F; Gul M; Ates B; Ozturk I.C; Cetin A et al. Protective effect of apricot (*Prunus armeniaca*L.) on hepatic steatosis and damage induced by carbon tetrachloride in Wistar rats/ *British Journal of Nutrition*, 102, 1767–1775. **2009**. Doi :10.1017/S0007114509991322.

P

Pal D; Verma P. Flavonoids: A Powerful and Abundant Source of Antioxidants/ *Int J Pharm Pharm Sci*, Vol 5, 95-98. **2013**.

Pan X; Hussain F.N; Iqbal J; Feuerman M.H; Hussain M.M. Inhibiting Proteasomal Degradation of Microsomal Triglyceride Transfer Protein Prevents CCl₄-induced Steatosis/ *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 282, pp. 17078–17089, **2007**.

Pandit A; Sachdeva T; Bafna P. Drug-Induced Hepatotoxicity: A Review/ *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (05); 233-243. **2012**. Doi: 10.7324/JAPS.2012.2541.

Pavanato M.A; Marroni N.P; Marroni C.A; Llesuy S.F. Quercetin Prevents Oxidative Stress in Cirrhotic Rats/ *Dig Dis Sci.* 52:2616–2621. **2007**. Doi: 10.1007/s10620-007-9748-x.

Pietta P.G. Flavonoids as Antioxidants/ *Journal of Natural Products* Vol. 63, 1035-1042. **2000**.

Pistelli L; Bertoli A; Giachi L; Morelli I; Rubiolo P; Bicchi C. Quinolizidine alkaloids from *Genista ephedroides*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29: 137-141. **2001**.

Q

Qu W; Huang H; Li K; Qin C. Danshensu-mediated protective effect against hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats/ *Pathologie Biologie* 62.348–353. **2014**.

R

Racchi.M.L. Antioxidant Defenses in Plants with Attention to *Prunus* and *Citrus* SPP/ *Antioxidants*, 2, 340-369; **2013**. Doi:10.3390/antiox2040340.

Raederstorff D; Wyss A; Calder P.C; Weber P; Eggersdorfer M. Vitamin E Function and Requirements In Relation To PUFA/ *British Journal of Nutrition* ; 114(8): 1113–1122; **2015**. Doi:10.1017/S000711451500272X.

Ravagnan L; Roumier T; Kroemer A. Mitochondria, the Killer Organelles and Their Weapons/ *Journal Of Cellular Physiology* 192: 131–137. **2002**. Doi: 10.1002/jcp.10111.

Ritesh K.R; Suganya A; Dileepkumarb H.V; Rajashekar Y; Shivanandappa T. A single acute hepatotoxic dose of CCl₄ causes oxidative stress in the rat brain/ *Toxicology Reports* 2. 891–895. **2015**.

Robin S; Sulin K; C A.R; Nidhi S. Different Models of Hepatotoxicity And Related Liver Diseases/ *International Research Journal Of Pharmacy* 3 (7) 86-95. **2012**.

Rolo A.P; Teodoro J.S; Palmeira C.M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis/ *Free Radical Biology & Medicine* 52. 59–69. **2012**. Doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.003.

Rosa D.P; Bona S; Simonetto D; Zettler C; Marroni C.A; Marroni N.P. Melatonin Protects The Liver And Erythrocytes Against Oxidative Stress In Cirrhotic Rats/ v. 47 – no.1 – jan./mar. **2010**.

Russmann S; Kullak-Ublick G.A; Grattagliano I. Current Concepts of Mechanisms in Drug-Induced Hepatotoxicity/ *Current Medicinal Chemistry*, 3041-3053. **2009**.

S

Salvayre A.N; Auge N; Ayala V; Basaga H; Boada J ; Brenke R; Chapple S et al. Pathological aspects of lipid peroxidation/ *Free Radical Research*; 44(10): 1125–1171. **2010**. DOI: 10.3109/10715762.2010.498478.

Sanmugapriya E; Venkataraman S. Studies on hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn. seeds on CCl₄-induced acute hepatic injury in experimental rats/ *Journal of Ethnopharmacology* 105. 154–160. **2006**. Doi: 10.1016/j.jep.2005.10.028.

Sannigrahi S; Mazumder U.K; Pal D.K; Mondal A; Roy S. Hepatoprotective Potential of Flavonoid Rich Fraction of *Enhydra Fluctuans* Against CCl₄-Induced Oxidative Damage in Rats/ *Pharmacologyonline2*: 575-586. **2009**.

Schaur R.J., Siems W., Bresgen N., Eckl P.M. 4-Hydroxy-nonenal A Bioactive Lipid Peroxidation Product/*Biomolecules.* ; 5(4):2247-2337. **2015**. Doi:10.3390/biom5042247..

Scholten D; Trebicka J; Liedtke C; Weiskirchen R. The carbon tetrachloride model in mice/ *Laboratory Animals*, Vol. 49 (S1) 4–11. **2015**. Doi : 10.1177/0023677215571192.

Schonborn J.L. The role of the liver in drug metabolism/anaesthesia tutorial of the week 179. 103-116. **2010**.

Schuppan D; Afdhal N.H. Liver cirrhosis/ *Lancet*; 371: 838–51. **2008**.

Sendensky A; Dufou J.F. *Liver Physiology/Clinical Gastroenterology: Chronic Liver Failure*. Springer Science+Business Media, LLC; pp 33-45. **2011**. Doi: 10.1007/978-1-60761-866-9_2.

Sharma P; Jha B.A; Dubey R.S; Pessarakli M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions/ *Journal of Botany*; Article ID 217037. **2012**. Doi :10.1155/2012/217037.

Shazia Q ; Mohammad Z.H; Taibur R; ShekharH. Correlation of Oxidative Stress with Serum Trace Element Levels and Antioxidant Enzyme Status in Beta Thalassemia Major Patients: A Review of the Literature/Anemia, Article ID 270923. **2012**. Doi :10.1155/2012/270923.

Shnkar N.L.G; Manavalan R; Venkappayya D; Raj C.D. Hepatoprotective and antioxidant effects of Commiphora berryi (Arn) Engl bark extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats/ Food and Chemical Toxicology 46. 3182–3185. **2008**. Doi :10.1016/j.fct.2008.07.010.

Sid B; Verrax J; Calderon P.B. Role of oxidative stress in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease/ Free Radical Research, ; 47(11): 894–904. **2013**.Doi: 10.3109/10715762.2013.819428.

Skonieczna M; Hejmo T; Hejmo A.P; Pobuda A.C; Buldak R.J. NADPH Oxidases: Insights into Selected Functions and Mechanisms of Action in Cancer and Stem Cells/ Oxidative Medicine and Cellular Longevity.**2017**. <https://doi.org/10.1155/2017/9420539>.

Stahl W; Berg H; J Arthur; Bast A; Dainty J et al. Bioavailability and metabolism/ Molecular Aspects of Medicine 23 39–100. **2002**.

Stojko A.R; Stojko J; Górecka A.K; Górecki M; Dzik A.K et al. Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity/ Molecules, 20, 21732–21749.**2015**. Doi :10.3390/molecules201219800.

T

Tamizhamuthu M; Merish S; Walter T.M; Raheema A.S. In-vitro Antioxidant activity of ‘Aswathy Chooranam’- a Siddha Drug/ 75 - 83 Journal Current Traditional Medicine. **2015**. Doi: 10.2174/2215083801666150701162809.

Tan H; He Q; Li R; Lei F; Lei X. Trillin Reduces Liver Chronic Inflammation and Fibrosis in Carbon Tetrachloride (CCl₄) Induced Liver Injury in Mice/ Immunological Investigations, Vol. 45, 371–382. **2016**.

Tělēs Y.C.F; Souza M.S.R; Souza M.F.V. Sulphated Flavonoids: Biosynthesis, Structures, and Biological Activities/ Molecules , 23, 480. **2018**.Doi:10.3390/molecules23020480.

Thonda V.S et Shivalinge G.K. Hepatotoxicity Mechanisms and its Biomarkers/ 675-682 International Journal Of Pharmaceutical And Chemical Sciences. **2012**.

Tiwari S.C; Husain N. Biological Activities And Role Of Flavonoids In Human Health–A Review/ Indian J.Sci.Res. 12 (2): 193-196. **2017**.

Trabera M.G; Stevensa J.F. Vitamins C and E: Beneficial Effects From a Mechanistic Perspective/ Free Radic Biol Med.; 51(5): 1000–1013. **2011**. Doi :10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.017.

Tuñón M.J; García-Mediavilla M.V; Campos S.S; Gallego J.G. Potential of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: Modulation of Pro-Inflammatory Gene Expression and Signal Transduction Pathways/ Current Drug Metabolism Vol. 10, 256-271. **2009**.

V

Vanlangenakker N; Berghe T.V; Krysko D.V; Festjens N; Vandenabeele P. Molecular Mechanisms and Pathophysiology of Necrotic Cell Death/ *Current Molecular Medicine*, 8, 207-220. **2008**.

Viskupičová A; Ondrejovič; Šturdík E. Bioavailability and metabolism of flavonoids/ *Journal of Food and Nutrition Research* Vol. 47, No. 4, pp. 151–162. **2008**.

W

Wang G; Li Z; Li H; Li L; Li J; Yu C. Metabolic Profile Changes of CCl₄-Liver Fibrosis and Inhibitory Effects of Jiaqi Ganxian Granule/ *Molecules* , 21, 698. **2016**.
Doi:10.3390/molecules21060698.

Wang T.Y; Li Q; Bi K.S. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate/ *A Sian Journal Of Pharmaceutical Sciences* 13, 12–23. **2018**.
<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>.

Wang Y; Yao H; Cui C; Wauthier E; Barbier C et al. Paracrine Signals from Mesenchymal Cell Populations govern Expansion and Differentiation of Human Hepatic Stem cells to Adult Liver Fates/*Hepatology*.; 52(4): 1443–1454. **2010**. Doi:10.1002/hep.23829.

Wijnen P; Opdenbuijsch R; Drent M; Kuipers P; Neef C et al. The prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms/ *Aliment Pharmacol Ther*26(Suppl 2), 211–219
Journal compilation. **2007**. Doi :10.1111/j.1365-2036.2007.03490.x.

Wojciechowski M; Lavin M; Sanderson M.J. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid MATK gene resolves many well-supported subclades within the family/ *American Journal of Botany*, 11 : 1846. **2004**.

X

Xie J; Yang L; Tian L; Li W; Yang L; Li L. Macrophage Migration Inhibitor Factor Upregulates MCP-1 Expression in an Autocrine Manner in Hepatocytes during Acute Mouse Liver Injury/ *Scientific Reports* | 6:27665 | **2016**. Doi: 10.1038/srep27665

Xu J; Ma H.Y; Liang S; Sun M; Karin G. The Role of Human Cytochrome P450 2E1 in Liver Inflammation and Fibrosis/ *Hepatology Communications*, Vol. 1, NO. 10. **2017**. Doi: 10.1002/hep4.1115.

Y

Y Weeb C; Twedt D. Oxidative Stress and Liver Disease/ *et Clin Small Anim* 38 125–135. **2008**. Doi :10.1016/j.cvsm.2007.10.001.

Yang B.Y; Zhang X.Y; Guan S.W; Hua Z.C. Protective Effect of Procyanidin B2 against CCl₄-Induced Acute Liver Injury in Mice/ *Molecules* , 20, 12250-12265. **2015**. Doi: 10.3390/molecules200712250.

Yin H; Xu L; Porter N.A. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis/ *Chem. Rev.*, 111, 5944–5972. **2011**. Doi:org/10.1021/cr200084z.

Yoshioka H; Usuda H; Miura N; Fukuishi N; Nonogaki T; Onosaka S. VitaminD3-Induced Hypercalcemia Increases Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity Through Elevated Oxidative Stress In Mice/ *PLOS ONE*. **2017**.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176524>.

Z

Zanger U.M; Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression,enzyme activities, and impact of genetic variation/ *Pharmacology & Therapeutics* 138; 103–141. **2013**.<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>.

Zhan Y.Y; Wang J.H; Tian X; Feng S; Xue L; Tian L.P. Protective effects of seed melon extract on CCl4-induced hepatic fibrosis in mice/ *Journal of Ethnopharmacology*.**2016**.

Zhang D.G; Zhang C; Wang J.X; Wang B.W; Wang H et al. Obeticholic acid protects against carbon tetrachloride-induced acute liver injury and inflammation/ *Toxicology and Applied Pharmacology* 314, 39–47. **2017**.

Ziegler U; Groscurth P. Morphological Features of Cell Death/ *Physiology* 19:124-128, **2004**. Doi:10.1152/nips.01519.2004.

Sites

<https://hepatologist.sharepoint.com/siteimages/hepatic%20sinusoid.jpg>.

Thème : L'effet préventif des flavonoïdes contre l'hépatotoxicité induite par le CCl₄.

Nature du diplôme : Master.

Domaine : Science de la nature et de la vie.

Mention : Toxicologie et santé.

Résumé :

La présente étude a été entreprise pour étudier l'effet hépatoprotecteur de l'extrait *n*-BuOH *Genista sp*, riche en flavonoïdes, sur les lésions hépatiques induites par le CCl₄. Des rats femelles de souche *Albinos wistar* ont été traités par gavage avec de l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* (200mg/kg) chaque jour pendant huit jours. L'hépatotoxicité a été induite le neuvième jour par l'administration intrapéritonéale d'une dose unique de CCl₄ (20% dans l'huile de tournesol à une dose de 2ml/kg de poids corporel).

L'activité antioxydante et hépatoprotective de l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* a été évaluée en mesurant, les transaminases sériques (AST et ALT), aussi le taux sérique des triglycérides (TG_s), le taux de MDA, l'activité de la SOD et le taux du GSH. Le CCl₄ non seulement a élevé les taux de MDA, d'ALT et d'AST, mais a également réprimé le système de défense antioxydant hépatique, y compris la SOD et le GSH de plus il a diminué la sécrétion des TG_s en augmentant ses taux sérique. Ces variations ont été améliorées après avoir administré l'extrait *n*-BuOH *Genista sp*, qui s'est traduit par une diminution significative des taux d'ALT, d'AST, des TG_s, du MDA, par (63,41%), (68,84%), (73,86), (79,91%) respectivement et l'augmentation significative de l'activité enzymatique de la SOD, du taux de GSH par (58,43%), (71,23%) respectivement. Les observations biochimiques ont été complétées par un examen histopathologique des coupes du foie des rats. L'examen histo-pathologique du foie a montré que l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* a réduit la dégénérescence cellulaire, l'infiltration des cellules inflammatoires, la nécrose et l'incidence de la stéatose hépatique chez les rats traités par cet extrait butanolique

Nos résultats suggèrent que l'extrait *n*-BuOH *Genista sp* riche en flavonoïdes pourrait être un agent hépatoprotecteur efficace et un candidat thérapeutique pour les troubles hépatiques et pour d'autres maladies liées au stress oxydatif.

Mots clés : Extrait *n*-BuOH *Genista sp*; Flavonoïdes, Hépatoprotecteur; Tétrachlorure de Carbone; Hépatotoxicité; Stress oxydatif.

Lieu de travail : Laboratoire de Biologie et environnement

UFM Constantine.

Jury d'évaluation :

Président : Mme Ameddah Souad

professeur

UFM Constantine.

Rapporteur : Mr BenrebaiMouad

MC-A

UFM Constantine.

Examineurs : Mme BâliNacira

MC-B

UFM Constantine.

Mr Kandouli Chouâib

MC-B

UFM Constantine.

